

DESCRIPTION

LIGAND HAVING AGONISTIC ACTIVITY TO MUTATED RECEPTOR

5

Technical Field

The present invention relates to ligands having agonistic activity to mutant receptors, and pharmaceutical compositions comprising the ligands as active ingredients.

10 Background Art

In recent years, the causative genes of various diseases have been identified in quick succession, and a variety of therapeutic methods for such diseases have been studied and established. Of these methods, the most intensively studied are mostly therapeutic methods for complementing enzyme gene deficiencies. It has been reported that enzyme replacement therapy using "Cerezyme" (Genzyme) is effective for patients with Gaucher's disease, in which β -glucocerebrosidase is deficient, and that enzyme replacement therapy using "Aldurazyme" (Genzyme) is effective for patients with mucopolysaccharidosis, in which α -L-iduronidase is deficient. Previously attempted gene therapies include introducing the adenosine deaminase (ADA) gene to patients with ADA deficiency, and introducing the coagulation factor IX gene to patients with hemophilia B. In addition to enzyme deficiencies, a large number of genetic diseases are known, such as genetic diseases of cytokines and their receptors. Some patients with type II diabetes mellitus, which accounts for approximately 90% of diabetes mellitus cases, have been reported to have insulin receptor deletions or mutations. Such deletions and mutations are assumed to cause the disease. Furthermore, some patients with thrombocytopenia have been reported to have thrombopoietin receptor deletions and mutations, and the failure of TPO signaling can be thought to cause the disease. To date, no fundamental therapeutic methods have been available for such genetic diseases, and the establishment of such therapeutic methods is expected.

Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT) is a rare disorder that causes 30 thrombocytopenia in infancy and pancytopenia in later childhood. It has been revealed that TPO, a thrombopoietic growth factor, is present in CAMT patients at a high concentration in sera, but that platelets and hematopoietic precursor cells lack TPO responsiveness. Most of these patients have been found to carry point mutations in their thrombopoietin receptor (c-MPL) gene. It has also been reported that such mutations result in frame shift or insertion of a termination 35 codon, leading to patients who have a total loss of thrombopoietin receptor function and patients who have a homozygous or heterozygous amino acid substitution in the extracellular domain of

the receptor (see Non-patent Document 1). Bone marrow transplant is the only currently available therapeutic method for treating such patients.

[Non-patent Document 1]

5 Matthias Ballmaier, Manuela Germeshausen, Harald Schulze, Klara Cherkaoui, Sabine Lang, Annika Gaudig, Stephanie Krukemeier, Martin Eilers, Gabriele Strausz, and Karl Welte, "BLOOD", vol. 97, No. 1, pp. 139 (January 1, 2001).

Disclosure of the Invention

10 The present invention was achieved in view of the circumstances described above. An objective of the present invention is to provide ligands having agonistic activity to mutant receptors.

15 The present inventors studied intensively to achieve the objective described above. By using antibody engineering techniques, the inventors prepared functional antibodies corresponding to each of the mutations in the causative genes of the diseases described above, discovering that these antibodies were useful to treat such diseases. Specifically, the inventors succeeded in preparing minibodies, each of which has agonistic activity to a mutant receptor that has almost completely lost responsiveness to its natural ligand due to gene mutation (for example, a thrombopoietin (TPO) receptor whose responsiveness to TPO is mostly lost), and which can transduce signals at levels comparable to normal levels when reacted with such a mutant receptor.

20 Diseases caused by gene mutations can be treated by using such antibodies or modified products thereof. Alternatively, such diseases can be treated by gene therapy using genes capable of expressing the antibodies or modified products thereof.

25 CAMT patients, who were previously difficult to treat, can now be treated using ligands having agonistic activity, such as the antibodies of the present invention or the genes encoding them.

30 In addition, the methods of the present invention are applicable to various other diseases caused by mutations in genes encoding receptors on cell membranes. Thus, the present invention can provide new therapeutic methods for these diseases.

Specifically, the present invention relates to ligands having agonistic activity to mutant receptors, more specifically provides:

- [1] a ligand having agonistic activity to a mutant receptor;
- [2] the ligand of [1], where the ligand is an antibody;
- 35 [3] the ligand of [1] or [2], where the ligand has greater agonistic activity to the mutant receptor than the natural ligand;

[4]. the ligand of any one of [1] to [3], where the mutant receptor is a receptor resulting from a mutation(s) in the amino acid sequence;

[5] the ligand of any one of [1] to [4], where the mutant receptor has lost responsiveness to the natural ligand;

5 [6] the ligand of any one of [1] to [5], where the mutant receptor causes a disease;

[7] the ligand of any one of [1] to [6], where the mutant receptor is a mutant thrombopoietin receptor;

[8] the ligand of [2], where the antibody is a minibody;

[9] the ligand of [8], where the minibody is a diabody;

10 [10] a method for transducing a signal to a mutant receptor by binding a ligand;

[11] the method of [10], where the ligand is an antibody;

[12] the method of [10] or [11], where the mutant receptor results from an amino acid mutation(s);

15 [13] the method of any one of [10] to [12], where the mutant receptor has lost responsiveness to the natural ligand;

[14] the method of any one of [10] to [13], where the mutant receptor is associated with disease onset;

[15] the method of any one of [10] to [14], where the mutant receptor is a mutant thrombopoietin receptor;

20 [16] a method for treating a disease caused by a mutant receptor, by binding a ligand to the mutant receptor;

[17] the method of [16], where the ligand is an antibody;

[18] a method of screening for a ligand having agonistic activity to a mutant receptor, where the method comprises the steps of,

25 (a) contacting a test substance with the mutant receptor,

(b) detecting a signal in the mutant receptor, and

(c) selecting a ligand having agonistic activity;

[19] a method of screening for a ligand having agonistic activity to a mutant receptor, where the method comprises the steps of,

30 (a) determining agonistic activity to a normal receptor,

(b) determining agonistic activity to the mutant receptor, and

(c) selecting a ligand having greater agonistic activity to the mutant receptor than the normal receptor;

[20] a method of screening for a ligand having agonistic activity to normal and mutant receptors, where the method comprises the steps of,

(a) determining agonistic activity to the normal receptor,

- (b) determining agonistic activity to the mutant receptor, and
- (c) selecting a ligand having agonistic activity to both normal and mutant receptors;

[21] the method of any one of [18] to [20], where the ligand is an antibody;

[22] a substance obtained by the method of any one of [18] to [21];

5 [23] a therapeutic agent for a disease caused by a mutant receptor, where the agent comprises a ligand of the mutant receptor;

[24] the therapeutic agent of [23], where the ligand is the ligand of any one of [1] to [9];

[25] the therapeutic agent of [23], where the ligand is an antibody;

[26] the therapeutic agent of any one of [23] to [25], where the mutant receptor results

10 from an amino acid mutation(s);

[27] the therapeutic agent of any one of [23] to [26], where the mutant receptor has lost responsiveness to the natural ligand;

[28] the therapeutic agent of any one of [23] to [27], where the mutant receptor is a mutant thrombopoietin receptor; and,

15 [29] the therapeutic agent of any one of [23] to [28], where the disease is congenital amegakaryocytic thrombocytopenia.

The present invention provides ligands having agonistic activity to mutant receptors.

Mutant receptors of the present invention are usually receptors that exist at a frequency of less than 50%, preferably less than 20%, more preferably less than 10%, and even more preferably less than 1%. The frequency is generally calculated using randomly selected subjects. However, the frequency may vary depending on country, area, sex, and such. Therefore, the frequency may also be calculated, for example, within a selected country or area such as Japan, the United States, or Europe, or be calculated for one sex. When there are two or more mutation sites in a receptor, the frequency may be calculated for multiple mutation sites or for any one of the mutation sites. Mutant receptors are preferably evaluated using frequency, as described above. However, mutant receptors can also be evaluated, for example, by their signal transducing ability. Specifically, for example, when two different receptors are present, the one with stronger transducing signals upon natural ligand-binding may be used as a non-mutant receptor, and the other with weaker transducing signals may be used as a mutant receptor.

30 Preferred mutant receptors of the present invention include, but are not limited to, receptors resulting from amino acid mutations (receptors with mutated amino acid sequences); however, any type of mutation is acceptable, as long as the mutated receptor influences responsiveness to natural ligands, or the conformation, sugar chain structure, or spatial relationship or angles when a receptor exists as a multimer, and so on. Mutations in the amino acid sequence include amino acid substitutions, deletions, insertions, and additions. The receptors of the present invention have preferably lost responsiveness to the natural ligands.

Herein, "ligand" refers to a substance that specifically binds to a functional protein. The type of ligand is not limited. Such ligands include low-molecular-weight compounds, proteins, and peptides. In the present invention, functional proteins are preferably receptors. In the present invention, ligands preferably have agonistic activity. The present invention also 5 provides methods for transducing signals to a mutant receptor by binding a ligand of the present invention. Such ligands for use in the methods of the present invention are preferably non-natural ligands, and not natural ligands.

In the present invention, it is preferred to target a mutant receptor whose responsiveness to a natural ligand is different from that of a non-mutant receptor. A "mutant receptor whose 10 responsiveness to a natural ligand is different from that of a non-mutant receptor" refers to a mutant receptor that exhibits agonistic activity and signaling activity that differs from the activities of the non-mutant receptor when the mutant and non-mutant receptors bind to the same natural ligand under the same conditions. In general, agonistic activity and signaling activity in mutant receptors is impaired compared with non-mutant receptors (the mutants have lost their 15 responsiveness to natural ligands).

The receptors include receptors belonging to the hematopoietic growth factor receptor family, the cytokine receptor family, the tyrosine kinase receptor family, the serine/threonine kinase receptor family, the TNF receptor family, the G protein-coupled receptor family, the GPI-anchored receptor family, the tyrosine phosphatase receptor family, the adhesion factor 20 family, and the hormone receptor family. There are many documents that describe receptors belonging to these receptor families, and their characteristics; for example Cooke BA, King RJB, van der Molen HJ Eds. New Comprehensive Biochemistry Vol.18B "Hormones and their Actions Part II" pp. 1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV, New York, USA; Patthy L. (1990) Cell, 61: 13-14; Ullrich A. *et al.* (1990) Cell, 61: 203-212; Massagul J. (1992) Cell, 69: 1067-1070; 25 Miyajima A. *et al.* (1992) Annu. Rev. Immunol., 10: 295-331; Taga T. and Kishimoto T. (1992) FASEB J., 7: 3387-3396; Fantl WI. *et al.* (1993) Annu. Rev. Biochem., 62: 453-481; Smith CA., *et al.* (1994) Cell, 76: 959-962; Flower DR. (1999) Biochim. Biophys. Acta, 1422: 207-234; Cell Technology: supplementary vol. Handbook series "Handbook for Adhesion factors" M. Miyasaka Ed. (1994) Shujunsha, Tokyo, Japan, and so on. Specific receptors belonging to the 30 families listed above include: human and mouse erythropoietin (EPO) receptors, human and mouse granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) receptors, human and mouse thrombopoietin (TPO) receptors, human and mouse insulin receptors, human and mouse Flt-3 ligand receptors, human and mouse platelet-derived growth factor (PDGF) receptors, human and mouse interferon (IFN)- α and - β receptors, human and mouse leptin receptors, human and mouse growth hormone (GH) receptors, human and mouse interleukin (IL)-10 receptors, human and mouse insulin-like growth factor (IGF)-I receptors, human and mouse leukemia inhibitory 35

factor (LIF) receptors, and human and mouse ciliary neurotrophic factor (CNTF) receptors (hEPOR: Simon, S. *et al.* (1990) Blood 76, 31-35; mEPOR: D'Andrea, AD. *Et al.* (1989) Cell 57, 277-285; hG-CSFR: Fukunaga, R. *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 8702-8706; mG-CSFR: Fukunaga, R. *et al.* (1990) Cell 61, 341-350; hTPOR: Vigon, I. *et al.* (1992) 89, 5 5640-5644; mTPOR: Skoda, RC. *Et al.* (1993) 12, 2645-2653; hInsR: Ullrich, A. *et al.* (1985) Nature 313, 756-761; hFlt-3: Small, D. *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 459-463; hPDGFR: Gronwald, RGK. *Et al.* (1988) Proc. Natl. acad. Sci. USA. 85, 3435-3439; hIFN α/β R: Uze, G. *et al.* (1990) Cell 60, 225-234, and Novick, D. *et al.* (1994) Cell 77, 391-400).

In one embodiment, the mutant receptors of the present invention comprise receptors associated with disease onset. The phrase "mutant receptors associated with disease onset" means that the loss of responsiveness to a natural ligand is part of the reason that disease onset is triggered. In the present invention, a mutant receptor is not necessarily the sole factor triggering disease onset, and may be a contributing factor. Many reports have been previously published describing the association of mutant receptors with disease onset; however, in addition to previously reported associations, associations of mutant receptors and disease onset can also be identified by methods of statistical analysis (for example, correlation analyses). Correlation analyses, also called "case control studies", are well known to those skilled in the art (for example, Nishimura, Y., 1991, "Statistical analysis of polymorphisms", Saishin Igaku, 46:909-923; Oka, A. *et al.*, 1990, Hum. Mol. Genetics 8, 2165-2170; Ota, M. *et al.*, 1999, Am. J. 10 Hum. Genet. 64, 1406-1410; Ozawa, A. *et al.*, 1999, Tissue Antigens 53, 263-268). For example, the correlation between a mutant receptor and a disease can be studied by determining the frequency of the mutant receptor in patients and in healthy subjects, and examining whether the patient population has a higher mutant receptor frequency. Typically, differences in the frequency are evaluated using the χ^2 -test. χ^2 is obtained by the equation $\chi^2 = \Sigma(\text{observed value} - \text{expected value})^2/\text{expected value}$. A p value is obtained from the χ^2 value thus determined. Whether a mutant receptor correlates with a disease can be determined based on this p value. For example, when p<0.05, a mutant receptor is considered to correlate with a disease.

There are many reports on mutant receptors known to be involved in disease onset. Such mutant receptors specifically include: mutant thrombopoietin (TPO) receptors, mutant insulin receptors, mutant erythropoietin receptors, mutant growth hormone receptors, mutant common γ chain receptors (common receptor of IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, and IL-21), mutant androgen receptors (Glutamine Repeats and Neurodegenerative Disease: Molecular Aspects (2001), 261-267, Oxford University press), mutant receptors for proopiomelanocortin (POMC) and melanocortin (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (2001), 86(4), 1442-1446), 15 mutant ryanodine receptors (Human Mutation (2000), 15(5), 410-417), mutant thyroid-stimulation hormone receptors (Trends in Endocrinology and Metabolism (1998), 9(4),

133-140), and mutant thyrotropin receptors (European Journal of Medical Research (1996), 1(10), 460-464). In the present invention, particularly preferred mutant receptors are mutant thrombopoietin receptors.

Herein, a “natural ligand” refers to a ligand in the body, and is preferably a ligand with
5 the most influence on non-mutant receptor signaling. Normally, the natural ligands of the present invention do not comprise antibodies.

“Agonistic activity” refers to the activity of inducing a change in a certain physiological activity, caused by transducing signals into cells upon the binding of a ligand to a receptor. The physiological activity includes, but is not limited to, growth-promoting activity, survival activity,
10 differentiation activity, transcription activity, membrane transport activity, binding activity, proteolytic activity, phosphorylation/dephosphorylation activity, oxidation/reduction activity, transfer activity, nucleolytic activity, and dehydration activity.

In the present invention, any detection indicator may be used to assay physiological activities, as long as it can measure quantitative and/or qualitative change. For example, it is
15 possible to use cell-free assay indicators, cell-based assay indicators, tissue-based assay indicators, and *in vivo* assay indicators. Indicators that can be used in cell-free assays include enzymatic reactions and quantitative and/or qualitative changes in proteins, DNAs, or RNAs. Such enzymatic reactions include amino acid transfers, sugar transfers, dehydrations, dehydrogenations, and substrate cleavages. Alternatively, the followings can be used: protein
20 phosphorylations, dephosphorylations, dimerizations, multimerizations, catabolisations, dissociations and such; and DNA or RNA amplifications, cleavages, and extensions. For example, protein phosphorylation downstream of a signal transduction pathway may be used as a detection indicator. As indicators in cell-based assays, changes to cell phenotype, for example, quantitative and/or qualitative changes in products, changes in proliferation activity,
25 morphological changes, or changes in cellular properties can be used. Products include secretory proteins, surface antigens, intracellular proteins, and mRNAs. Morphological changes include changes in process formation and/or process number, changes in cell flatness, changes in the degree of elongation/horizontal to vertical ratio, changes in cell size, changes in intracellular structure, heterogeneity/homogeneity of cell populations, and changes in cell density.
30 Such morphological alterations can be observed under a microscope. Cellular properties to be used include anchorage dependency, cytokine-dependent responsiveness, hormone dependency, drug resistance, cell motility, cell migration activity, pulsatility, and alteration in intracellular substances. Cell motility includes cell infiltration activity and cell migration activity. Changes in intracellular substances include changes in enzyme activity, mRNA levels, levels of
35 intracellular signaling molecules such as Ca^{2+} and cAMP, and intracellular protein levels. Furthermore, changes in the cell proliferation activity induced by receptor stimulation can be

used as an indicator. The indicators to be used in tissue-based assays include functional changes for the tissue in use. Indicators that can be used for *in vivo* assays include changes in tissue weight, changes in the blood system (for example, changes in the number of hemocytes, protein contents, or enzyme activities), changes in electrolyte levels, and changes in the circulatory system (for example, changes in blood pressure or heart rate).

The methods for measuring such detection indicators are not particularly limited. For example, luminescence, color development, fluorescence, radioactivity, fluorescence polarization values, surface plasmon resonance signals, time-resolved fluorescence, mass, absorption spectrums, light scattering, and fluorescence resonance energy transfers may be used. These measurement methods are known to those skilled in the art and may be appropriately selected depending on the purpose. For example, absorption spectra can be measured using a conventional photometer, plate reader, or such; luminescence can be measured with a luminometer or such; and fluorescence can be measured with a fluorometer or such. Mass can be determined with a mass spectrometer. Radioactivity can be determined with a measurement device such as a gamma counter, depending on the type of radiation. Fluorescence polarization values can be measured using BEACON (TaKaRa). Surface plasmon resonance signals can be obtained using BIACORE. Time-resolved fluorescence, fluorescence resonance energy transfer, or such can be measured with ARVO or such. Furthermore, a flow cytometer can also be used for measuring. In the present invention, it is possible to use a chimeric receptor comprising an extracellular domain of a mutant receptor and a cytoplasmic domain of another protein. For example, when the cytoplasmic domain of G-CSF receptor, EPO receptor, EGF receptor, or thrombopoietin receptor is used, the cell proliferation activity induced by stimulating the receptor can be used as a detection indicator. In assays using cell proliferation activity as a detection indicator, cell lines that die in the absence of ligands are preferably used to improve detection sensitivity. Cytokine-dependent cell lines are particularly preferred because they can be easily passaged. For example, it is possible to use CTLL-2 cells, which are an IL-2-dependent cell line, and 32D cells, FDC-P1 cells, and Ba/F3 cells, which are IL-3-dependent cell lines. These cell lines will die two or three day after the start of culture when a cytokine such as IL-2 or IL-3 that is essential for cell proliferation, is eliminated from the culture media. It is preferable to use FDC-P1 cells and Ba/F3 cells that express a chimeric receptor comprising the cytoplasmic domain of mouse G-CSF receptor.

The ligands of the present invention that have agonistic activity are not particularly limited, as long as they have agonistic activity to mutant receptors. Such ligands may have agonistic activity to both mutant and non-mutant receptors, or may only have agonistic activity to mutant receptors. When the ligands have agonistic activity to both mutant and non-mutant receptors, they may have greater agonistic activity to the non-mutant receptor, or greater

agonistic activity to the mutant receptor. Alternatively, the ligands may have comparable agonistic activity to the non-mutant and mutant receptors. Nonetheless, when the chief purpose is to treat a disease caused by a mutant receptor, it is preferable to use a ligand with greater agonistic activity to the mutant receptor than the non-mutant receptor.

5 The antibodies of the present invention are not particularly limited, as long as they have agonistic activity, and mouse antibodies, rat antibodies, rabbit antibodies, sheep antibodies, camel antibodies, chimeric antibodies, humanized antibodies, human antibodies, and such can be appropriately used. Such antibodies may be polyclonal or monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies are preferred because they can be stably produced as homogeneous 10 antibodies. Both polyclonal and monoclonal antibodies can be prepared by methods known to those skilled in the art.

Hybridomas producing monoclonal antibodies can basically be prepared by the conventional methods described below. Specifically, immunization is carried out by a conventional immunization method, using a desired antigen or cells expressing the desired 15 antigen as a sensitizing antigen. The prepared immunocytes are fused with known parental cells by a conventional cell fusion method. The fused cells are screened for monoclonal antibody-producing cells (hybridomas) by conventional screening methods.

The type of sensitizing antigen to be used is not limited. For example, a full-length protein of a receptor of interest, or a partial peptide thereof (for example, an extracellular 20 domain) can be used. The antigens can be prepared by methods known to those skilled in the art; for example, according to methods using baculovirus (for example, see WO 98/46777). Hybridomas can be prepared, for example, by the method of Milstein *et al.* (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol., 1981, 73, 3-46.). When an antigen has weak immunogenicity, the antigen may be conjugated with a large immunogenic molecule such as albumin, to achieve 25 immunization. In addition, the present invention may use recombinant antibodies, produced by gene engineering. The genes encoding the antibodies are cloned from hybridomas, inserted into an appropriate vector, and then introduced into a host (see, e.g., Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, Published in the United Kingdom by Macmillan Publishers Ltd, 1990). Specifically, using a reverse transcriptase, cDNAs encoding 30 the variable regions (V regions) of the antibodies are synthesized from the mRNAs of the hybridomas. DNAs encoding the variable regions of the antibodies of interest are obtained, and ligated with DNAs encoding desired constant regions (C regions) of the antibodies, and these constructs are inserted into expression vectors. Alternatively, DNAs encoding the variable regions of the antibodies may be inserted into expression vectors comprising the DNAs of the 35 antibody C regions. Those cDNAs are inserted into expression vectors such that the genes are expressed under the regulation of an expression regulatory region, for example, an enhancer and

promoter. Host cells are then transformed using the expression vectors, and the antibodies can be expressed. The epitopes on the molecules that are recognized by antibodies of the present invention are not limited to particular epitopes. The antibodies may recognize any epitope on the molecules. Typically, the antibodies recognize epitopes in the extracellular domain. In the present invention, recombinant antibodies artificially modified to reduce heterologous antigenicity against humans can be used. Examples of such recombinant antibodies include chimeric antibodies and humanized antibodies. These modified antibodies can be produced using known methods. A chimeric antibody comprises heavy chain and light chain variable regions of an antibody from a nonhuman mammal such as a mouse, and heavy chain and light chain constant regions of a human antibody. Such an antibody can be obtained by (1) ligating a DNA encoding a variable region of a mouse antibody to a DNA encoding a constant region of a human antibody; (2) inserting the resulting construct into an expression vector; and (3) introducing the vector into a host for production of the antibody. A humanized antibody, which is also called a reshaped human antibody, is obtained by transferring a complementarity determining region (CDR) of an antibody of a nonhuman mammal such as a mouse, to the CDR of a human antibody. Conventional genetic recombination techniques for the preparation of such antibodies are known. Specifically, a DNA sequence designed to ligate a CDR of a mouse antibody with the framework regions (FRs) of a human antibody is synthesized by PCR, using several oligonucleotides constructed to comprise overlapping portions at their ends. A humanized antibody can be obtained by (1) ligating the obtained DNA to a DNA that encodes a human antibody constant region; (2) inserting the resulting construct into an expression vector; and (3) introducing the vector into a host to produce the antibody (see European Patent Application No. EP 239,400, and International Patent Application No. WO 96/02576). Human antibody FRs ligated via the CDR are selected where the CDR forms a favorable antigen-binding site. As necessary, amino acids in the framework region of an antibody variable region may be substituted such that the CDR of a reshaped human antibody forms an appropriate antigen-binding site (Sato, K. *et al.*, *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856). Methods for obtaining human antibodies are also known. For example, desired human antibodies with antigen-binding activity can be obtained by (1) sensitizing human lymphocytes with antigens of interest or cells expressing antigens of interest *in vitro*; and (2) fusing the sensitized lymphocytes with human myeloma cells such as U266 (see Japanese Patent Application Kokoku Publication No. (JP-B) H01-59878 (examined, approved Japanese patent application published for opposition)). Alternatively, the desired human antibodies can also be obtained by using antigens of interest to immunize transgenic (Tg) animals comprising a partial or entire repertoire of human antibody genes (see International Patent Application WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, and WO 96/33735). Furthermore, techniques to

obtain human antibodies by panning with a human antibody library are known. For example, the variable regions of human antibodies are expressed as single chain antibodies (scFvs) on the surface of phages, using a phage display method, and the phages that bind to the antigen can be selected. By analyzing the genes of selected phages, the DNA sequences encoding the variable 5 regions of human antibodies that bind to the antigen can be determined. If the DNA sequences of scFvs that bind to the antigen are identified, appropriate expression vectors comprising these sequences can be constructed to obtain human antibodies. Such methods are already well known (see WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 10 95/01438, and WO 95/15388). When the antibody genes are isolated and introduced into appropriate hosts to produce antibodies, hosts and expression vectors can be used in appropriate combinations. Eukaryotic host cells that can be used are animal cells, plant cells, and fungal 15 cells. The animal cells include: (1) mammalian cells such as CHO, COS, myeloma, baby hamster kidney (BHK), HeLa, and Vero cells; (2) amphibian cells such as *Xenopus* oocytes; or (3) insect cells such as sf9, sf21, and Tn5. Known plant cells include cells derived from the 20 *Nicotiana* genus such as *Nicotiana tabacum*, which can be callus-cultured. Known fungal cells include yeasts such as the *Saccharomyces* genus, for example *Saccharomyces cerevisiae*, and filamentous fungi such as the *Aspergillus* genus, for example *Aspergillus niger*. Prokaryotic cells can also be used in production systems that utilize bacterial cells. Known bacterial cells include *E. coli* and *Bacillus subtilis*. The antibodies can be obtained by introducing the antibody genes of interest into these cells by transformation, and then culturing the transformed 25 cells *in vitro*.

The antibodies may be minibodies or modified products of antibodies, as long as they can bind to antigens. In the present invention, a minibody comprises an antibody fragment obtained by deleting a portion from a whole antibody (for example, whole IgG). There is no limitation on the type of minibody, as long as it has the ability to bind to an antigen. The 30 antibody fragments of the present invention are not particularly limited, as long as they are portions of whole antibodies. The antibody fragments preferably comprise a heavy chain variable region (VH) or a light chain variable region (VL), and particularly preferably comprise both a VH and VL. Specifically, the antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, and scFv (single-chain Fv). A preferred antibody fragment is scFv (Huston, J. S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883; and Plickthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113, Eds. Resenburg and Moore, Springer Verlag, New York, pp. 269-315, 35 (1994)). Such an antibody fragment can be prepared by treating an antibody with an enzyme (for example, papain or pepsin) or by inserting a gene construct encoding the antibody fragment into an expression vector and expressing it in appropriate host cells (see, for example, Co, M. S. *et al.*, J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol.

(1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; and Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137). The minibodies of the present invention preferably have a smaller molecular weight than whole antibodies. However, the minibodies may form multimers (for example, dimers, trimers, or tetramers), and thus their molecular weights can be greater than those of whole antibodies.

Preferred minibodies of the present invention comprise two or more antibody VHs and two or more antibody VLs, in which each of the variable regions are directly linked, or indirectly linked together via linkers or such. The linkages may be covalent or non-covalent bonds, or comprise both covalent and non-covalent bonds. More preferred minibodies are antibodies comprising two or more VH-VL pairs formed via non-covalent bonding between VH and VL. The distance between the two VH-VL pairs in a minibody is preferably less than that in the whole antibody.

Particularly preferred minibodies of the present invention are diabodies and sc(Fv)2. A diobody is a dimerized fragment in which two variable regions are linked together via a linker or such (for example, scFv) (hereinafter, referred to as "a fragment constituting a diobody"), and which typically comprises two VL and two VH (P. Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6444-6448 (1993), EP 404097; WO 93/11161; Johnson *et al.*, Methods in Enzymology, 203, 88-98, (1991); Holliger *et al.*, Protein Engineering, 9, 299-305, (1996); Perisic *et al.*, Structure, 2, 1217-1226, (1994); John *et al.*, Protein Engineering, 12(7), 597-604, (1999); Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90, 6444-6448, (1993); Atwell *et al.*, Mol. Immunol. 33, 1301-1312, (1996)). The links between fragments constituting a diobody may be non-covalent or covalent bonds, and are preferably non-covalent bonds.

Alternatively, two fragments constituting a diobody can be linked together via a linker to form a single-chain diobody (scDiobody). When the fragments constituting the diobody are linked together using a long linker, comprising approximately 20 amino acids, it is possible to link the fragments constituting the diobody in the same chain using a non-covalent bond, forming a dimer.

Fragments constituting diabodies include a VL and VH linked together, a VL and VL linked together, a VH and VH linked together, and the like. A VH and VL linked together is preferred. There is no limitation on the type of linker for linking a variable region and variable region in a fragment constituting a diobody. However, it is preferable to use a linker short enough to prevent formation of a non-covalent bond between variable regions in the same fragment. Those skilled in the art can appropriately select the length of such linkers; however, their length is typically 2 to 14 amino acids, preferably 3 to 9 amino acids, and particularly preferably 4 to 6 amino acids. In these cases, the linker between the VL and VH encoded by

the same fragment is short, and thus no non-covalent bonds are formed between VL and VH on the same chain. Thus, a single-chain V region fragment is not formed, and the VL and VH form dimers with other fragments via non-covalent bonds. Further, based on the same principle for producing diabodies, a multimerized antibody such as a trimer or tetramer can be prepared by 5 linking three or more fragments constituting a diabody.

The sc(Fv)2 of the present invention are single-chain minibodies produced by linking two VHs and two VLs with linkers and such (Hudson *et al.*, 1999, J Immunol. Methods 231:177-189). sc(Fv)2 exhibit a particularly high agonistic activity compared to whole antibodies and other minibodies. sc(Fv)2 can be produced, for example, by linking scFv 10 molecules with a linker.

In a preferable antibody, two VHs and two VLs are arranged in the order of VH, VL, VH, and VL ([VH]-linker-[VL]-linker-[VH]-linker-[VL]), beginning from the N terminus of a single-chain polypeptide.

The order of the two VHs and two VLs is not limited to the above arrangement, and 15 they may be arranged in any order. Examples of arrangements are listed below:

[VL]-linker-[VH]-linker-[VH]-linker-[VL]

[VH]-linker-[VL]-linker-[VL]-linker-[VH]

[VH]-linker-[VH]-linker-[VL]-linker-[VL]

[VL]-linker-[VL]-linker-[VH]-linker-[VH]

20 [VL]-linker-[VH]-linker-[VL]-linker-[VH]

The linkers for linking the variable regions of an antibody can be arbitrary peptide linkers that can be introduced by genetic engineering, or synthetic linkers (for example, see Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996). However, peptide linkers are preferred in the present invention. There are no limitations as to the length of the peptide linkers. The length 25 can be appropriately selected by those skilled in the art, depending on the purpose, and is typically 1 to 100 amino acids, preferably 3 to 50 amino acids, more preferably 5 to 30 amino acids, and even more preferably 12 to 18 amino acids (for example, 15 amino acids).

For example, such peptide linkers include:

Ser

30 Gly Ser

Gly Gly Ser

Ser Gly Gly

Gly Gly Gly Ser

Ser Gly Gly Gly

35 Gly Gly Gly Gly Ser

Ser Gly Gly Gly Gly

Gly Gly Gly Gly Ser
Ser Gly Gly Gly Gly
Gly Gly Gly Gly Gly Ser
Ser Gly Gly Gly Gly Gly
5 (Gly Gly Gly Ser)_n
(Ser Gly Gly Gly Gly)_n

where n is an integer of one or larger. The lengths and sequences of peptide linkers can be appropriately selected by those skilled in the art, depending on the purpose.

In an embodiment of the present invention, particularly preferable sc(Fv)2 include the 10 sc(Fv)2 below:

[VH]-peptide linker (15 amino acids)-[VL]-peptide linker (15 amino acids)-[VH]-peptide linker (15 amino acids)-[VL]

Synthetic linkers (chemical cross-linking agents) include cross-linking agents routinely used to cross-link peptides; for example, N-hydroxy succinimide (NHS), disuccinimidyl suberate 15 (DSS), bis(succinimidyl) suberate (BS³), dithiobis(succinimidyl propionate) (DSP), dithiobis(succinimidyl propionate) (DTSSP), ethylene glycol bis(succinimidyl succinate) (EGS), ethylene glycol bis(sulfosuccinimidyl succinate) (sulfo-EGS), disuccinimidyl tartrate (DST), disulfosuccinimidyl tartrate (sulfo-DST), bis[2-(succinimidoxycarbonyloxy)ethyl] sulfone (BSOCOES), and bis[2-(succinimidoxycarbonyloxy)ethyl] sulfone (sulfo-BSOCOES). These 20 cross-linking agents are commercially available.

In general, three linkers are required to link four antibody variable regions together. The linkers to be used may be of the same or different types. In the present invention, a preferable minibody is a diabody, even more preferably, an sc(Fv)2. Such a minibody can be prepared by treating an antibody with an enzyme, for example, papain or pepsin, to generate 25 antibody fragments, or by constructing DNAs encoding those antibody fragments and introducing them into expression vectors, followed by expression in an appropriate host cell (see, for example, Co, M. S. *et al.*, 1994, J. Immunol. 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., 1989, Methods Enzymol. 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., 1989, Methods Enzymol. 178, 497-515; Lamoyi, E., 1986, Methods Enzymol. 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, 1986, 30 Methods Enzymol. 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., 1991, Trends Biotechnol. 9, 132-137).

Antibodies with extremely high agonistic activity can be prepared by converting whole antibodies into minibodies.

Modified antibodies for use include antibodies linked to various molecules, such as 35 polyethylene glycol (PEG). Alternatively, it is also possible to link an antibody to a radioisotope, chemotherapeutic agent, or cytotoxic substance such as a bacterial toxin. Such

modified antibodies can be prepared by chemically modifying an obtained antibody. Methods for modifying antibodies have been previously established in the art.

Further, antibodies for use in the present invention may be bispecific antibodies. A bispecific antibody may comprise two antigen-binding sites that each recognizes different epitopes on a certain molecule. Alternatively, one of the antigen-binding sites may recognize a certain molecule, and the other may recognize a radioactive substance, chemotherapeutic agent, or cytotoxic substance such as a cell-derived toxin. When such cytotoxic substances are used, tumor cell growth can be suppressed by directly adding the cytotoxic substance to cells that express a certain molecule, and specifically damaging the tumor cells. The bispecific antibodies can be prepared by linking pairs of H and L chains from two types of antibodies, or by fusing hybridomas which produce different monoclonal antibodies to produce a fused cell producing a bispecific antibody. Further, bispecific antibodies can be prepared using genetic engineering techniques.

Antibodies in which sugar chains have been modified can also be used in the present invention. Techniques for modifying antibody sugar chains have been previously reported (for example, WO 00/61739 and WO 02/31140).

An "antibody" of the present invention includes the antibodies described above.

The antibodies expressed or produced as described above can be purified by conventional protein purification methods. The antibodies can be separated and purified, for example, by the combined use of methods appropriately selected from affinity columns such as a protein A column, column chromatography, filtration, ultrafiltration, salting out, dialysis, and so on (*Antibodies A Laboratory Manual*. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

The antigen-binding activity of an antibody can be assayed by conventional methods (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). For example, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), enzyme immunoassay (EIA), radioimmunoassay (RIA), or immunofluorescence method can be used.

The present invention also provides methods of screening for ligands having agonistic activity to mutant receptors. In these methods, first, a test substance (test compound) is contacted with a mutant receptor. The "contact" of a test substance with a mutant receptor is typically achieved by adding the test substance to a culture medium or extract of cells expressing the mutant receptor. The methods for achieving contact are not limited to this method. When the test substance is a protein or such, the "contact" can be achieved by introducing a DNA vector expressing the protein into the cells.

In these methods, the next step comprises detecting signals from the mutant receptor. Signals can be detected by the methods described above.

Next, ligands with agonistic activity are selected based on comparison with cases when a test substance (control) is not contacted. The ligands selected in this way are expected to become therapeutic agents for treating or preventing diseases associated with receptor deficiencies or mutations.

5 In another embodiment, a screening method of the present invention comprises the first step of contacting a test substance with a normal receptor and measuring agonistic activity. Next, the same test substance is contacted with a mutant receptor, and agonistic activity is measured. Ligands with high agonistic activity to the mutant receptor as compared to a normal receptor are then selected.

10 In still another embodiment, a screening method of the present invention comprises the first step of contacting a test substance with a normal receptor and measuring the agonistic activity. Next, the same test substance is contacted with a mutant receptor and agonistic activity is measured. Ligands with agonistic activity to both the mutant receptor and normal receptor are then selected.

15 Measuring agonistic activity in the methods described above can be achieved as described above.

Substances (compounds) obtained by the above-described screening methods of the present invention are also comprised in the present invention.

Since the ligands of the present invention (for example, antibodies) have agonistic activity, they are expected to be effective therapeutic agents for diseases caused by the impaired response of receptors on which the ligands act. Such impaired responses are attributed to receptor deficiencies or mutations. Specifically, the present invention provides therapeutic agents comprising the above-described ligands of the present invention, which are used to treat diseases caused by the mutant receptors. Representative examples of the diseases described above are thrombocytopenia, type II diabetes mellitus, and Laron syndrome.

A preferred example of a disease of the present invention is congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT).

When ligands of the present invention or substances (compounds) obtained by the methods for screening of the present invention are used as pharmaceutical compositions, they can be formulated by methods known to those skilled in the art. As necessary, the ligands or substances can be used orally, for example, as sugar-coated tablets, capsules, elixirs, or microcapsules, or parenterally, as injections of sterile solutions or suspensions comprising water or other pharmaceutically acceptable liquids. For example, the ligands or the substances can be formulated by appropriately combining with pharmaceutically acceptable carriers or solvents, specifically, sterile water or physiological saline, vegetable oils, emulsifiers, suspending agents, surfactants, stabilizers, flavoring agents, excipients, vehicles, preservatives, binding agents, and

such, and mixing at a unit dosage and form required by accepted pharmaceutical implementations. In such formulations, the amount of the active ingredient should be within the required range.

Additives in the tablets or capsules can include, for example, binders such as gelatin, 5 corn starch, gum tragacanth, and gum Arabic; excipients such as crystalline cellulose; swelling agents such as corn starch, gelatin, and alginic acid; lubricants such as magnesium stearate; edulcorants such as sucrose, lactose, or saccharin; and flavoring agents such as peppermint, Gaultheria adenothrix oil, and cherry. When the unit dosage form is a capsule, the above-described materials can also comprise a liquid carrier such as oil. A sterile composition 10 for injection can be formulated using a vehicle such as distilled water used for injection, according to standard protocols.

Aqueous solutions used for injections include physiological saline and isotonic solutions comprising glucose or other adjunctive agents such as D-sorbitol, D-mannose, D-mannitol, and sodium chloride. They may also be combined with an appropriate solubilizing agent such as 15 alcohol, specifically, ethanol, polyalcohol such as propylene glycol or polyethylene glycol, or non-ionic detergent such as polysorbate 80TM or HCO-50.

Oil solutions include sesame oils and soybean oils, and can be combined with solubilizing agents such as benzyl benzoate or benzyl alcohol. They may also be formulated with buffers, for example, phosphate buffers or sodium acetate buffers; analgesics, for example, 20 procaine hydrochloride; stabilizers, for example, benzyl alcohol or phenol; or anti-oxidants. The prepared injections are typically aliquoted into appropriate ampules.

The administration may be carried out orally or parenterally, and preferably parenterally. Specifically, injection, intranasal administration, intrapulmonary administration, percutaneous 25 administration, or such can be used. Injections include intravenous injections, intramuscular injections, intraperitoneal injections, and subcutaneous injections. The injection solutions can also be systemically or locally administered. The administration methods can be properly selected according to the patient's age, condition, and such. When the compounds can be encoded by DNA, the DNA can be inserted into a vector for gene therapy, and gene therapy can be carried out. The dosage may be, for example, in the range of 0.0001 to 1,000 mg/kg body 30 weight. Alternatively, the dosage may be, for example, in the range of 0.001 to 100,000 mg/person. However, the dosage is not restricted to the values described above. The dosage and administration methods depend on a patient's weight, age, and condition, and can be appropriately selected by those skilled in the art.

35 **Brief Description of the Drawings**

Fig. 1 is a diagram showing the structure of a pCOS2-hMPLfull vector.

Fig. 2 is a diagram showing the structure of a pCOS2-hMPLfullG305C vector.

Fig. 3 is a diagram showing the structure of a pBACsurf1-hMPL-FLAG vector.

Fig. 4 is a diagram showing the agonistic activity of each of the diabodies and hTPO in pCOS2-HA-Ba/F3. The vertical axis indicates O.D.450/655 nm and the horizontal axis indicates the concentration.
5

Fig. 5 is a diagram showing the agonistic activity of each of the diabodies and hTPO in hMPL-Ba/F3. The vertical axis indicates O.D.450/655 nm and the horizontal axis indicates the concentration.

Fig. 6 is a diagram showing the agonistic activity of each of the diabodies and hTPO in hMPL(G305C)-Ba/F3. The vertical axis indicates O.D.450/655 nm and the horizontal axis indicates the concentration.
10

Fig. 7 is a diagram showing the structure of a pCOS2-hMPLfullC769T vector.

Fig. 8 is a diagram showing the structure of a pCOS2-hMPLfullC823A vector.

Fig. 9 is diagram showing the construction of a TA136 sc(Fv)2 gene.

15 Fig. 10 is a diagram showing the structure of a pCXND3-TA136 sc(Fv)2 vector.

Fig. 11 is a diagram showing the agonistic activity of TA136 db and TA136 sc(Fv)2 in hMPL-Ba/F3 cells. The vertical axis indicates O.D.450/655 nm and the horizontal axis indicates the concentration.

Fig. 12 is a diagram showing the agonistic activity of TA136 db and TA136 sc(Fv)2 in hMPL(G305C)-Ba/F3 cells. The vertical axis indicates O.D.450/655 nm and the horizontal axis indicates the concentration.
20

Fig. 13 is a diagram showing the agonistic activity of TA136 db and TA136 sc(Fv)2 in hMPL(C769T)-Ba/F3 cells. The vertical axis indicates O.D.450/655 nm and the horizontal axis indicates the concentration.

25 Fig. 14 is a diagram showing the agonistic activity of TA136 db and TA136 sc(Fv)2 in hMPL(C823A)-Ba/F3 cells. The vertical axis indicates O.D.450/655 nm and the horizontal axis indicates the concentration.

Best Mode for Carrying Out the Invention

30 Herein below, the present invention will be specifically described using Examples, however, it is not to be construed as being limited thereto.

[Example 1] Establishment of a Ba/F3 cell line

Several reports have described CAMT patients carrying the G305C (R102P) mutation in
35 their thrombopoietin receptor gene. In this context, an expression vector for the thrombopoietin receptor gene carrying the G305C (R102P) mutation was constructed and introduced into Ba/F3

cells by the method described below. The prepared DNA fragments were: the normal thrombopoietin receptor gene (SEQ ID NO: 1) and the mutant gene in which the C at nucleotide position 305 from the initiation codon has been substituted for G (SEQ ID NO: 3). These DNA fragments were digested with the restriction enzymes *Eco*RI and *Sa*I, and introduced into the 5 *Eco*RI-*Sa*I site of the animal cell expression vector pCOS2-Ha to prepare pCOS2-hMPLfull (Fig. 1) and pCOS2-hMPLfullG305C (Fig. 2).

After the plasmids pCOS2-hMPLfull, pCOS2-hMPLfullG305C, and as a negative control pCOS2-Ha were treated with *Pvu*I, 20 µg of each plasmid was transfected into Ba/F3 cells under the conditions described below. The gene was introduced at a cell density of 1x 10⁷ 10 cells/ml in PBS using GENE PULSER II (BIO-RAD) (Gene Pulser Cuvette, 0.4 cm; 0.33 kV; 950 µF). The medium was then changed with RPMI1640 comprising 10% FBS, 1 ng/ml rmIL3 (Pepro tech), 500 µg/ml Geneticin(GIBCO), 100 unit/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin to select cells. As a result, hMPL-Ba/F3, hMPL(G305C)-Ba/F3, and pCOS2-HA-Ba/F3 cell lines were obtained from the respective vectors described above.

15

[Example 2] Preparation of the extracellular domain protein of thrombopoietin receptor

To prepare the antigen for producing anti-thrombopoietin receptor antibodies, a system for producing and secreting the extracellular domain of human thrombopoietin receptor using the insect cell line Sf9 was constructed as described below. A gene construct comprising FLAG tag placed downstream of the extracellular domain of human thrombopoietin receptor (Gln26-Trp491) was prepared and inserted into the *Pst*I-*Sma*I site of pBACsurf-1 (Novagen), to construct pBACsurf1-hMPL-FLAG (Fig. 3). The resulting gene construct (SEQ ID NO: 5) can secrete the extracellular domain of thrombopoietin receptor using a secretory signal sequence derived from baculovirus gp64 protein. 4 µg of the vector was transfected into Sf9 cells using 20 Bac-N-Blue Transfection Kit (Invitrogen), according to the protocol attached to the kit. After three days of culture, the culture supernatants were collected and recombinant viruses were isolated using plaque assays. Stock viral solutions were prepared, and then infected to Sf9 cells. The resulting culture supernatants were collected, and adsorbed to a Q Sepharose Fast Flow column (Pharmacia). The column was eluted with PBS comprising 500 mM NaCl and 0.01% 25 Tween20. The eluate was adsorbed to M2 Affinity Resin (Sigma). The resins were eluted with 100 mM Glycine-HCl (pH 3.5) comprising 0.01% Tween20. Immediately after elution, the eluate was neutralized with 1M Tris-Cl (pH 8.0). The resulting solution was treated by gel filtration chromatography using Superdex 200 26/60 (PBS comprising 0.01% Tween20) to purify 30 the protein.

35

[Example 3] Preparation of anti-thrombopoietin receptor diabody

MRL/lpr mice were immunized seven times with the purified protein of the TPOR extracellular domain. The first immunization was carried out using 100 µg of the protein, and subsequent immunizations were each performed using 50 µg of protein. The immunized cells were fused with P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) cells by methods commonly used to prepare hybridomas. The hybridomas that produced anti-thrombopoietin receptor antibodies were selected by ELISA assay using the purified protein (VB08B, VB45B, VB033, VB140, and VB157).

Meanwhile, Balb/c mice were immunized a total of 11 times with hMPL-Ba/F3 cells at one-week to five-month intervals. 1.0×10^7 cells were intraperitoneally administered to the mice each time. Hybridomas were then prepared by the same method as described above. The hybridomas that produced anti-thrombopoietin receptor antibody were selected (TA136).

The cDNAs for the variable regions of the antibody H and L chains were cloned from each of the hybridomas thus prepared. The cloned cDNAs were sequenced. Based on the nucleotide sequences, genes encoding diabodies were designed with FLAG tag at their C termini (VB08B db, VB45B db, VB033 db, VB140 db, VB157 db, and TA136 db), and inserted into the expression vector pCXND3 for animal cells (pCXND3-VB08B db, pCXND3-VB45B db, pCXND3-VB033 db, pCXND3-VB140 db, pCXND3-VB157 db, pCXND3-TA136 db). Each prepared vector was introduced into COS7 cells, and the culture supernatant was collected after three days of culture. The concentration of diabody in each culture supernatant was determined by BIACore (Pharmacia) using M2 antibody (Sigma).

[Example 4] Assay for diabody dependency of Ba/F3 cell line

pCOS2-HA-Ba/F3 cells, hMPL_Ba/F3 cells, and hMPL(G305C)-Ba/F3 cells were each diluted to 2.0×10^5 cells/ml with medium (RPMI1640 comprising 10% FBS, 100 unit/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin). The cells were aliquoted (60 µl/well) into the wells of 96-well plates. hTPO (R&D) was diluted to a final concentration of 25 µg/ml with CHO-S-SFM II, and then aliquoted into the wells (40 µl/well). Each diabody/COS7 sup (VB08B db, VB45B db, VB033 db, VB140 db, VB157 db, and TA136 db) was diluted 1, 3, 9, 27, 81, and 243 times using CHO-S-SFM II, and then aliquoted into the wells (40 µl/well). The plates were incubated for 24 hours, and then Cell Count Reagent (nacalai tesque) was added to each well (10 µl/well). The O.D.450/655 nm of each well was measured after two hours of culture. The result showed that the responsiveness of hMPL(G305C)-Ba/F3 cells to hTPO and other agonistic antibodies was markedly decreased. However, TA136 db (SEQ ID NO: 7) was found to exhibit strong agonistic activity to hMPL(G305C)-Ba/F3 cells, while it exhibited weak agonistic activity to hMPL_Ba/F3 cells expressing the normal receptor (Figs. 4to 6).

In SEQ ID NO: 8, the amino acid sequence from positions 49 to 54 corresponds to

heavy chain CDR1; from 69 to 84 corresponds to heavy chain CDR2; from 117 to 123 corresponds to heavy chain CDR3; from 163 to 174 corresponds to light chain CDR1; from 190 to 196 corresponds to light chain CDR2; and from 229 to 237 corresponds to light chain CDR3.

5 [Example 5] Establishment of a Ba/F3 cell line (2)

As in Example 1, expression vectors were constructed for each of the mutant thrombopoietin receptor genes carrying the C769T (R257C) mutation and the C823A (P275T) mutation, which were found in some CAMT patients. The constructs were introduced into Ba/F3 cells. Nucleotide T was substituted for the nucleotide C at position 769 from the 10 initiation codon in the thrombopoietin receptor gene (SEQ ID NO: 1), to produce the gene of SEQ ID NO: 9; and nucleotide A was substituted for the nucleotide C at position 823, to produce the gene of SEQ ID NO: 11. These DNA fragments were digested with the restriction enzymes *Eco*RI and *Sal*I, and introduced into the *Eco*RI-*Sal*I site of the animal cell expression vector pCOS2-Ha to obtain pCOS2-hMPLfullC769T (Fig. 7) and pCOS2-hMPLfullC823A (Fig. 8), 15 respectively.

After treating the plasmids pCOS2-hMPLfullC769T and pCOS2-hMPLfullC823A with *Pvu*I, 20 µg of each of them was transfected into Ba/F3 cells under the conditions described below. The gene transfer was carried out by electroporation at a cell density of 1x 10⁷ cells/ml in PBS using GENE PULSER II (BIO-RAD) (Gene Pulser Cuvette 0.4 cm; 0.33 kV; 950 µF). 20 The medium was then changed to RPMI1640 comprising 10% FBS, 1 ng/ml rmIL3 (Pepro tech), 500 µg/ml Geneticin (GIBCO), 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin to select cells. As a result, hMPL(C769T)-Ba/F3 and hMPL(C823A)-Ba/F3 cell lines were respectively obtained from the vectors described above.

25 [Example 6] Preparation of anti-thrombopoietin receptor antibody sc(FV)2

TA136 sc(Fv)2 gene was constructed using pCXND3-TA136 db described above by the procedure described below (Fig. 9).

PCR was carried out using a combination of primer A (TAGAATTCCACCATGAGAGTGCTGATTCTTGTGGCTGTTCACAGCCTTCCTGGTA 30 CCCTGTCTGATGTGCAGCTGCAGG/SEQ ID NO: 15) and primer B (TGGGTGAGAACAAATTGCGATCCGCCACCACCGAACCAACCACCCGAACCACC ACCACCTGAGGAGACGGTGACTGAGG/SEQ ID NO: 16); and also a combination of primer C (CAGTCACCGTCTCCTCAGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGC 35 GGATCGCAAATTGTTCTCACCCAGTC/SEQ ID NO: 17) and primer D (ATTGCGGCCGCTTATCACTTATCGTCGTACCTCTGTAGTCTTGATTCCAGCTTGGT

G/SEQ ID NO: 18). The resulting PCR products were combined and used as a template in another PCR using primers A and D. The resulting DNA fragment of about 800 bp was digested using the restriction enzymes *EcoRI* and *NotI*, and cloned into pBacPAK9 (CLONTECH) to prepare pBacPAK9-scTA136.

5 PCR was then carried out using pBacPAK9-scTA136 as a template with primer E (GATGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGAC/SEQ ID NO: 19) and primer F (CCTGCAGCTGCACATCCGATCCACCGCCTCCGAACCACCACCCGATCCACCAC CTCCTTGATTCCAGCTTGGTGC/SEQ ID NO: 20). The resulting DNA fragment of approximately 800 bp was cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega).

10 After confirming the nucleotide sequence, the DNA was digested with the restriction enzyme *PvuII*. The resulting DNA fragment of approximately 800 bp was inserted into the *PvuII* site of pBacPAK9-scTA136 to prepare pBacPAK9-TA136 sc(Fv)2. The prepared vector was digested with the restriction enzymes *EcoRI* and *NotI*. The resulting DNA fragment of approximately 1600 bp was cloned into the expression vector pCXND3 to prepare
15 pCXND3-TA136 sc(Fv)2 (SEQ ID NO: 13; Fig. 10).

[Example 7] Evaluation of TPO-like agonistic activities of TA136 db and TA136 sc(Fv)2

The DNA constructs pCXND3-TA136 db and pCXND3-TA136 sc(Fv)2 were introduced into COS7 cells. Their respective culture supernatants were collected after three
20 days of culture. The diabody concentrations in the prepared culture supernatants were determined by BIACore (Pharmacia) using M2 antibody (Sigma).

25 hMPL-Ba/F3 cells, hMPL(G305C)-Ba/F3 cells, hMPL(C769T)-Ba/F3 cells, and hMPL(C823A)-Ba/F3 cells were each diluted to 4.0×10^5 cells/ml using medium (RPMI1640 comprising 10% FBS, 100 unit/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin). The cells were aliquoted into the wells of 96 well plates (60 μ l/well). 40 μ l of hTPO (R&D) and the culture supernatant of the COS7 cells described above were added to each well, and the plate was incubated for 24 hours. 10 μ l of Cell Count Reagent (Nacalai Tesque) was added to each well. O.D.450/655 nm was determined after incubating the plate for two hours.

30 The results showed that, in all three mutant thrombopoietin receptor cell lines, TA136 sc(Fv)2 exhibited much stronger agonistic activity than hTPO and TA136 db (Figs. 12 to 14). Furthermore, TA136 db was found to show agonistic activity comparable to that of the natural ligand hTPO when converted into sc(Fv)2, although in hMPL-Ba/F3 cells expressing normal thrombopoietin receptor, TA136 db exhibited weaker activity than that of hTPO (Fig. 11).

35 Industrial Applicability

The present invention provides ligands (antibodies) to treat patients with diseases

caused by mutant receptors, for example, CAMT; polynucleotides encoding these antibodies; vectors comprising the polynucleotides; host cells comprising the vectors; and methods for producing the antibodies. In addition, the present invention also provides methods for gene therapy using polynucleotides that encode the antibodies. The methods of the present invention
5 provide methods for treating various genetic diseases caused by mutations in genes that encode cell membrane proteins. Henceforth, individualized genetic diagnosis is likely to become widely available for patients. The antibody engineering techniques of the present invention enable the development of pharmaceutical agents matched to individual genotypes.

CLAIMS

1. A ligand having agonistic activity to a mutant receptor.
2. The ligand of claim 1, where the ligand is an antibody.
- 5 3. The ligand of claim 1 or 2, where the ligand has greater agonistic activity to the mutant receptor than the natural ligand.
4. The ligand of any one of claims 1 to 3, where the mutant receptor is a receptor resulting from a mutation(s) in the amino acid sequence.
- 10 5. The ligand of any one of claims 1 to 4, where the mutant receptor has lost responsiveness to the natural ligand.
6. The ligand of any one of claims 1 to 5, where the mutant receptor causes a disease.
7. The ligand of any one of claims 1 to 6, where the mutant receptor is a mutant thrombopoietin receptor.
- 15 8. The ligand of claim 2, where the antibody is a minibody.
9. The ligand of claim 8, where the minibody is a diabody.
10. A method for transducing a signal to a mutant receptor by binding a ligand.
11. The method of claim 10, where the ligand is an antibody.
12. The method of claim 10 or 11, where the mutant receptor results from an amino acid mutation(s).
- 20 13. The method of any one of claims 10 to 12, where the mutant receptor has lost responsiveness to the natural ligand.
14. The method of any one of claims 10 to 13, where the mutant receptor is associated with disease onset.
- 25 15. The method of any one of claims 10 to 14, where the mutant receptor is a mutant thrombopoietin receptor.
16. A method for treating a disease caused by a mutant receptor, by binding a ligand to the mutant receptor.
17. The method of claim 16, where the ligand is an antibody.
18. A method of screening for a ligand having agonistic activity to a mutant receptor,
- 30 where the method comprises the steps of:
 - (a) contacting a test substance with the mutant receptor;
 - (b) detecting a signal in the mutant receptor; and
 - (c) selecting a ligand having agonistic activity.
19. A method of screening for a ligand having agonistic activity to a mutant receptor,
- 35 where the method comprises the steps of:
 - (a) determining agonistic activity to a normal receptor;

(b) determining agonistic activity to the mutant receptor; and

(c) selecting a ligand having greater agonistic activity to the mutant receptor than the normal receptor.

20. A method of screening for a ligand having agonistic activity to a normal and a
5 mutant receptor, where the method comprises the steps of:

(a) determining agonistic activity to the normal receptor;

(b) determining agonistic activity to the mutant receptor; and

(c) selecting a ligand having agonistic activity to both the normal and the mutant
receptors.

10 21. The method of any one of claims 18 to 20, where the ligand is an antibody.

22. A substance obtained by the method of any one of claims 18 to 21.

23. A therapeutic agent for a disease caused by a mutant receptor, where the agent
comprises a ligand of the mutant receptor.

15 24. The therapeutic agent of claim 23, where the ligand is the ligand of any one of
claims 1 to 9.

25. The therapeutic agent of claim 23, where the ligand is an antibody.

26. The therapeutic agent of any one of claims 23 to 25, where the mutant receptor
results from an amino acid mutation(s).

20 27. The therapeutic agent of any one of claims 23 to 26, where the mutant receptor has
lost responsiveness to the natural ligand.

28. The therapeutic agent of any one of claims 23 to 27, where the mutant receptor is a
mutant thrombopoietin receptor.

29. The therapeutic agent of any one of claims 23 to 28, where the disease is congenital
amegakaryocytic thrombocytopenia.

ABSTRACT

The present inventors used antibody engineering techniques to prepare functional antibodies that correspond to individual mutations in causative genes of diseases, and discovered
5 that such antibodies enable the treatment of the diseases. Specifically, the inventors succeeded in preparing ligands, particularly minibodies, which have agonistic activity to receptors that have almost completely lost responsiveness to their natural ligands because of gene mutations (for example, a thrombopoietin (TPO) receptor whose reactivity to TPO has been markedly impaired), and which can transduce signals by interacting with these mutant receptors at levels comparable
10 to normal.

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日

2004年9月23日 (23.09.2004)

PCT

(10)国際公開番号

WO 2004/081048 A1

(51)国際特許分類7: C07K 16/28, A61K 39/395, A61P 7/00, 7/04, G01N 33/15, 33/50

(74)代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP2004/003334

(22)国際出願日: 2004年3月12日 (12.03.2004)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願2003-067832 2003年3月13日 (13.03.2003) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 土屋 政幸 (TSUCHIYA, Masayuki) [JP/JP]; 〒4120038 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 平田 裕一 (HIRATA, Yuichi) [JP/JP]; 〒3004101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 中外製薬株式会社内 Ibaraki (JP).

(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: LIGAND HAVING AGONISTIC ACTIVITY TO MUTATED RECEPTOR

(54)発明の名称: 変異受容体に対するアゴニスト活性を有するリガンド

(57) Abstract: It is found out that a functional antibody corresponding to an individual mutation of a gene causative of a disease can be constructed by using antibody engineering techniques, thereby enabling treatment for the disease. More specifically speaking, a receptor almost losing its natural activity to a ligand due to mutation (for example, a mutated thrombopoietin receptor with extremely lowered thrombopoietin (TPO) reactivity) is treated with a ligand having an agonistic activity. Thus, a ligand having a signal transduction function at a level closely similar to the normal level (in particular, a degraded antibody) can be successfully constructed.

(57)要約: 疾患の原因遺伝子の変異に個別に対応した機能性抗体を、抗体工学技術を駆使して作製し、疾患に対する治療を可能とすることを見出した。具体的には、遺伝子変異により天然のリガンドに対する反応性がほとんど失われたレセプター（例えば、トロンボポイエチン(TPO)反応性の著しく低下した変異トロンボポイエチン受容体）に対して、アゴニスト活性を持つリガンドを作用させることにより、正常レベルに近いシグナルを伝達し得る作用を有するリガンド、特に低分子化抗体の作製に成功した。

WO 2004/081048 A1

- 1 -

明細書

変異受容体に対するアゴニスト活性を有するリガンド

5 技術分野

本発明は、変異受容体に対してアゴニスト活性を有するリガンド、および該リガンドを有効成分として含有する医薬組成物に関する。

背景技術

10 近年、遺伝子疾患の原因遺伝子が次々と明らかになり、その様々な治療法が研究され確立されつつある。その中で最も良く研究されているのは、主に酵素遺伝子の欠損を補う治療法である。β-グルコセレブロシダーゼが欠損したゴーシェ病患者に対する「セレザイム」(Genzyme)による酵素補充療法、alpha-L-iduronidaseが欠損したムコ多糖症に対する「Aldurazyme」(Genzyme)による酵素補充療法等が有効である事が示されている。遺伝子を導入する試みとしては、アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症患者に対するADA遺伝子の導入や、血友病B患者に対する血液凝固第IX因子遺伝子を導入する試み等がなされている。酵素欠損以外にも数多くの遺伝子疾患が知られており、サイトカインやそのレセプターの遺伝子疾患も知られている。糖尿病の約9割を占める2型糖尿病患者の一部では、インスリンレセプターの欠損や変異が報告されており、発病の原因と考えられている。

15 また、血小板減少症の患者の中には、そのトロンボポエチン受容体の欠損や変異が報告されており、TP0のシグナルが伝達されない事が病気の原因と考えられている。このような遺伝子疾患には未だ根本的な治療法は無く、その治療法の確立が望まれている。

20 Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT; 先天性無巨核球性血小板減少症) はまれな病気で、幼年期には血小板減少(thrombocytopenia)、幼年

- 2 -

時代後期には無形成性貧血 (pancytopenia) を引き起こす疾患である。CAMT患者の血清中には、血小板造血因子であるTPOは高濃度に存在しているが、血小板や造血前駆細胞のTPOに対する反応性が失われている事が明らかにされている。それらの患者のトロンボポエチン受容体 (c-MPL) 遺伝子を解析すると、ほとんどの場合、ポイントミューテーションが見出される。それらの変異によりフレームシフトや終止コドンが挿入され、全くトロンボポエチン受容体の機能が失われた患者や、ヘテロやホモで細胞外ドメインにアミノ酸置換が導入されている患者がいる事が報告されている（非特許文献1参照）。現在、骨髄移植のみがこれらの患者の唯一の治療法である。

10 [非特許文献1]

Matthias Ballmaier, Manuela Germeshausen, Harald Schulze, Klara Cherkaoui, Sabine Lang, Annika Gaudig, Stephanie Krukemeier, Martin Eilers, Gabriel e Strausz, and Karl Welte著、「BLOOD」、1 JANUARY 2001、VOL97、NUM 1、P1
39

15

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、変異受容体に対してアゴニスト活性を有するリガンドを提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決するため銳意研究を行い、上記疾患の原因遺伝子の変異に個別に対応した機能性抗体を、抗体工学技術を駆使して作製し、上記疾患に対する治療を可能とすることを見出した。具体的には、遺伝子変異により天然のリガンドに対する反応性がほとんど失われたレセプター（例えば、トロンボポエチン(TPO)反応性の著しく低下した変異トロンボポエチン受容体）に対してアゴニスト活性を持つ抗体を作用させることにより、正常レベルに近いシグナルを伝達し得る作用を有する低分子化抗体を作製することに成功した。

このような抗体やその改変体を用いることにより、遺伝子変異に起因する疾患

- 3 -

の治療が可能と考えられた。また、それらを発現しうる遺伝子を用いた遺伝子治療による治療も可能である。

本発明の抗体等のアゴニスト活性を有するリガンドやそれをコードする遺伝子を用いることにより、治療の困難なCAMT患者に治療を施す道が開かれた。

5 また、本発明による手法は、細胞膜上のレセプターをコードする遺伝子の変異に起因する他の様々な疾患に対しても応用可能であり、新しい治療法を提供することが可能である。

即ち本発明は、変異受容体に対するアゴニスト活性を有するリガンドに関し、より具体的には、

10 [1] 変異受容体に対して、アゴニスト活性を有するリガンド、
[2] リガンドが抗体であることを特徴とする、〔1〕に記載のリガンド、
[3] 変異受容体に対して、天然リガンドより高いアゴニスト活性を有することを特徴とする、〔1〕または〔2〕に記載のリガンド、
[4] 変異受容体が、アミノ酸配列の変異に起因する受容体であることを特徴
15 とする、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載のリガンド、
[5] 変異受容体が、天然のリガンドに対する反応性が失われていることを特徴とする、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のリガンド、
[6] 変異受容体が疾患の原因となっている受容体であることを特徴とする、
〔1〕～〔5〕のいずれかに記載のリガンド、
20 [7] 変異受容体が、トロンボポエチン受容体の変異受容体であることを特徴とする、〔1〕～〔6〕のいずれかに記載のリガンド、
[8] 抗体が低分子化抗体である、〔2〕に記載のリガンド、
[9] 低分子化抗体がダイアボディである、〔8〕に記載のリガンド、
〔1.0〕 リガンドを結合させることにより変異受容体にシグナルを伝達する方
25 法、
〔11〕 リガンドが抗体であることを特徴とする、〔10〕に記載の方法、

- 4 -

[12] 変異受容体が、アミノ酸変異に起因する受容体であることを特徴とする、[10] または [11] に記載の方法、

[13] 変異受容体が、天然のリガンドに対する反応性が失われていることを特徴とする、[10] ~ [12] のいずれかに記載の方法、

5 [14] 変異受容体が疾患の発症と関連している受容体であることを特徴とする、[10] ~ [13] のいずれかに記載の方法、

[15] 変異受容体が、トロンボポエチン受容体の変異受容体であることを特徴とする、[10] ~ [14] のいずれかに記載の方法、

[16] 変異受容体にリガンドを結合させることにより、変異受容体に起因す
10 る疾患を治療する方法、

[17] リガンドが抗体である、[16] に記載の方法、

[18] 以下の工程を含む、変異受容体に対してアゴニスト活性を有するリガ
15 ンドのスクリーニング方法、

(a) 変異受容体に被検物質を接触させる工程、
(b) 変異受容体におけるシグナルを検出する工程、
15 (c) アゴニスト活性を有するリガンドを選択する工程、

[19] 以下の工程を含む、変異受容体に対してアゴニスト活性を有するリガ
15 ンドのスクリーニング方法、

(a) 正常受容体に対するアゴニスト活性を測定する工程、
20 (b) 変異受容体に対するアゴニスト活性を測定する工程、
(c) 正常受容体と比較して、変異受容体において高いアゴニスト活性を
20 有するリガンドを選択する工程

[20] 以下の工程を含む、変異受容体と正常受容体に対してアゴニスト活性
25 を有するリガンドのスクリーニング方法、

(a) 正常受容体に対するアゴニスト活性を測定する工程、
(b) 変異受容体に対するアゴニスト活性を測定する工程、

- 5 -

(c) 正常受容体と変異受容体の両方にアゴニスト活性を有するリガンドを選択する工程

[21] リガンドが抗体である、[18]～[20]のいずれかに記載のスクリーニング方法、
5 [22] [18]～[21]のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られた物質、
[23] 変異受容体に対するリガンドを含有する、変異受容体に起因する疾患の治療薬、
[24] リガンドが[1]～[9]のいずれかに記載のリガンドである、[2
10 3]に記載の治療薬、
[25] リガンドが抗体である、[23]に記載の治療薬、
[26] 変異受容体が、アミノ酸変異に起因する受容体であることを特徴とする、[23]～[25]のいずれかに記載の治療薬、
[27] 変異受容体が、天然のリガンドに対する反応性が失われていることを特徴とする、[23]～[26]のいずれかに記載の治療薬、
15 [28] 変異受容体がトロンボポイエチン受容体の変異受容体であることを特徴とする、[23]～[27]のいずれかに記載の治療薬、
[29] 疾患が先天性無巨核球性血小板減少症である、[23]～[28]のいずれかに記載の治療薬、
20 を提供するものである。

本発明は、変異受容体に対してアゴニスト活性を有するリガンドを提供する。

本発明において変異受容体とは、通常、50%未満の頻度で存在する受容体であり、好ましくは20%未満の頻度で存在する受容体であり、さらに好ましくは10%未満の頻度で存在する受容体であり、特に好ましくは1%未満の頻度で存在する受容体である。頻度は通常、任意に抽出された被験者において計算された頻度が用いられるが、国や地域、性別などにより頻度に偏りがある場合もあるので、例えば、

日本、アメリカ、欧州などのように国や地域を限定して頻度を算出したり、性別を限定して頻度を算出するなどしてもよい。又、1つの受容体について変異が複数個所に存在する場合には、複数の個所を組み合わせて頻度を算出してもよいし、1つの変異個所に絞って頻度を算出してもよい。変異受容体の判断は上述のように

5 頻度で行うことが好ましいが、例えば、シグナル伝達能力等で変異受容体の判断を行うことも可能である。具体的には、例えば、2つの異なる受容体が存在する場合、天然リガンドが結合した際にシグナル伝達が強い方を非変異受容体とし、シグナル伝達が弱い方を変異受容体としてもよい。

本発明の変異受容体としては、例えば、アミノ酸変異に起因する受容体（アミノ酸配列が変異している受容体）が好ましいが、本発明はそれらに限定されず、立体構造、糖鎖構造、受容体が多量体として存在する場合にはそれぞれの位置関係・角度など、天然リガンドに対する反応性に影響を与えるものであればどのような変異でもよい。アミノ酸配列の変異には、アミノ酸の置換、欠失、挿入、付加などがある。本発明の受容体は、天然のリガンドに対する反応性が失われていることが好ましい。

本発明においてリガンドとは、機能タンパク質に特異的に結合する物質のことをしていい、低分子化合物、タンパク質、ペプチドなど、その種類は限定されない。本発明において好ましい機能タンパク質は受容体である。本発明において好ましいリガンドは、アゴニスト活性を有するリガンドである。また本発明は、本発明のリガンドを結合させることにより変異受容体にシグナルを伝達させる方法を提供する。本方法に用いられるリガンドは、天然リガンド以外の非天然リガンドであることが好ましい。

本発明は、天然リガンドに対する反応性が非変異受容体と異なっている変異受容体を対象とすることが好ましい。天然リガンドに対する反応性が非変異受容体と異なっている変異受容体とは、同一の天然リガンドを同一の条件下で変異受容体と非変異受容体に結合させた場合に、アゴニスト活性の強さやシグナル伝達の

強さ等が非変異受容体とは異なっている変異受容体のことをいう。通常、変異受容体では、非変異受容体よりアゴニスト活性やシグナル伝達が弱くなっている（天然リガンドに対する反応性が失われている）。

受容体の例としては、例えば、造血因子受容体ファミリー、サイトカイン受容体ファミリー、チロシンキナーゼ型受容体ファミリー、セリン／スレオニンキナーゼ型受容体ファミリー、TNF受容体ファミリー、G蛋白質共役型受容体ファミリー、GPIアンカー型受容体ファミリー、チロシンホスファターゼ型受容体ファミリー、接着因子ファミリー、ホルモン受容体ファミリー、等の受容体ファミリーに属する受容体などを挙げることができる。これら受容体ファミリーに属する受容体、及びその特徴に関しては多数の文献が存在し、例えば、Cooke BA., King RJ B., van der Molen HJ. ed. New Comprehesive Biochemistry Vol. 18B "Hormones and their Actions Part II" pp. 1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV., New York, USA、Patthy L. (1990) Cell, 61: 13-14.、Ullrich A., et al. (1990) Cell, 61: 203-212.、Massagul J. (1992) Cell, 69: 1067-1070.、Miyajima A., et al. (1992) Annu. Rev. Immunol., 10: 295-331.、Taga T. and Kishimoto T. (1992) FASEB J., 7: 3387-3396.、Fantl WI., et al. (1993) Annu. Rev. Biochem., 62: 453-481.、Smith CA., et al. (1994) Cell, 76: 959-962.、Flower DR. (1999) Biochim. Biophys. Acta, 1422: 207-234.、宮坂昌之監修、細胞工学別冊ハンドブックシリーズ「接着因子ハンドブック」(1994) (秀潤社、東京、日本) 等が挙げられる。上記受容体ファミリーに属する具体的な受容体としては、例えば、ヒト又はマウスエリスロポエチン(EPO)受容体、ヒト又はマウス顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体、ヒト又はマウストロンボポイエチン(TPO)受容体、ヒト又はマウスインスリン受容体、ヒト又はマウスFlt-3リガンド受容体、ヒト又はマウス血小板由来増殖因子(PDGF)受容体、ヒト又はマウスインターフェロン(IFN)- α 、 β 受容体、ヒト又はマウスレプチン受容体、ヒト又はマウス成長ホルモン(GH)受容体、ヒト又はマウスインターロイキン(IL)-10受容体、ヒト又

はマウスインスリン様増殖因子 (IGF) -I受容体、ヒト又はマウス白血病抑制因子 (LIF) 受容体、ヒト又はマウス毛様体神経栄養因子 (CNTF) 受容体等を例示することができる (hEPOR: Simon, S. et al. (1990) Blood 76, 31-35. ; mEPOR: D'Andrea, AD. Et al. (1989) Cell 57, 277-285. ; hG-CSFR: Fukunaga, R. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 8702-8706. ; mG-CSFR: Fukunaga, R. et al. (1990) Cell 61, 341-350. ; hTPOR: Vigon, I. et al. (1992) 89, 5640-5644. ; mTPOR: Skoda, RC. Et al. (1993) 12, 2645-2653. ; hInsR: Ullrich, A. et al. (1985) Nature 313, 756-761. ; hFlt-3: Small, D. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 459-463. ; hPDGFR: Gronwald, RGK. Et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 3435-3439. ; hIFN α/β R: Uze, G. et al. (1990) Cell 60, 225-234. 及び Novick, D. et al. (1994) Cell 77, 391-400.)。

本発明の変異受容体の一つの態様としては、疾患の発症と関連している受容体を挙げることができる。変異受容体が疾患の発症と関連するとは、天然のリガンドに対する反応性が失われることが一因となり、疾患の発症が誘発されることをいう。本発明においては、変異受容体は疾患の発症の一因を担っていればよく、変異受容体が疾患の発症の全ての原因である必要はない。現在までに変異受容体と疾患の発症の関連については多くの報告があるが、既に報告されている関連以外にも、変異受容体が疾患の発症と関連するか否かは統計的解析方法（例えば、相関解析など）により確認することも可能である。相関解析はケースコントロール研究とも言われ、当業者によく知られた解析方法である（例えば、西村泰治：多型の統計学的用法、最新医学 46:909-923, (1991)、Oka A et al., Hum. Mol. Genetcs 8, 2165-2170 (1990)、Ota M et al., Am. J. Hum. Genet. 64, 1406-1410 (1999)、Ozawa A et al., Tissue Antigens 53, 263-268 (1999)など）。例えば、患者と健常者で変異受容体の頻度を測定し、患者において有意に変異受容体の頻度が上昇しているか否かを調べることにより、変異受容体と疾患の間の相関を調べることができる。通常、頻度の違いは、 χ^2 検定で検討され、 $\chi^2 = \Sigma$

(観察値－期待値)²/期待値で得られる。得られた χ^2 から p 値を得ることができる。

変異受容体と疾患が相関しているか否かは p 値から判定することができ、例えば、
p < 0.05 の場合、変異受容体と疾患が相関していると判定することができる。

疾患の発症との関連が知られている変異受容体については多くの報告があるが、

5 具体的な例としては、例えば、トロンボポイエチン(TPO)受容体の変異受容体、インシュリン受容体の変異受容体、エリスロポエチン受容体の変異受容体、成長ホルモン受容体の変異受容体、コモンγチェーン(IL-2、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21の共通レセプター)の変異受容体、アンドロゲン受容体の変異受容体(Glutamin Repeats and Neurodegenerative Disease: Molecular Aspects (2001), 261-267, Oxford University press)、proopiomelanocortin(POMC)、meralocortin受容体の変異受容体 (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (2001), 86 (4), 1442-1446)、Ryanodine受容体の変異受容体 (Human Mutation (2000), 15 (5), 410-417)、thyroid-stimulation hormone受容体の変異受容体 (Trends in Endocrinology and Metabolism (1998), 9 (4), 133-140)、thyrotropin受容体の変異受容体 (European Journal of Medical Research (1996), 1 (10), 460-464)などを挙げることができる。本発明において特に好ましい変異受容体はトロンボポイエチン受容体の変異受容体である。

本発明において、天然リガンドとは、生体内に存在しているリガンドのことをいい、好ましくは非変異受容体のシグナル伝達に最も影響を与えるリガンドである。本発明における天然リガンドには通常、抗体は含まれない。

アゴニスト活性とは、受容体にリガンドが結合することにより、細胞内にシグナルが伝達され、何らかの生理的活性の変化を誘導する活性である。生理的活性としては、例えば、増殖活性、生存活性、分化活性、転写活性、膜輸送活性、結合活性、蛋白質分解活性、リン酸化／脱リン酸化活性、酸化還元活性、転移活性、核酸分解活性、脱水活性などを挙げることができるが、これらに限定されるわけではない。

- 10 -

本発明において、生理的活性の変化を測定する為に用いる検出指標は、量的および／又は質的な変化が測定可能である限り使用することができる。例えば、無細胞系 (cell free assay) の指標、細胞系 (cell-based assay) の指標、組織系の指標、生体系の指標を用いることができる。無細胞系の指標としては、酵素反応や
5 タンパク質、DNA、RNAの量的および／又は質的な変化を用いることができる。酵素反応としては、例えば、アミノ酸転移反応、糖転移反応、脱水反応、脱水素反応、基質切断反応等を用いることができる。また、タンパク質のリン酸化、脱リ
ン酸化、二量化、多量化、分解、乖離等や、DNA、RNAの增幅、切断、伸長を用い
ることができる。例えばシグナル伝達経路の下流に存在するタンパク質のリン酸
10 化を検出指標とすることができる。細胞系の指標としては、細胞の表現型の変化、
例えば、産生物質の量的及び／又は質的変化、増殖活性の変化、形態の変化、特
性の変化等を用いることができる。産生物質としては、分泌タンパク質、表面抗
原、細胞内タンパク質、mRNA等を用いることができる。形態の変化としては、突
起形成及び／又は突起の数の変化、偏平度の変化、伸長度／縦横比の変化、細胞
15 の大きさの変化、内部構造の変化、細胞集団としての異形性／均一性、細胞密度
の変化等を用いることができる。これらの形態の変化は検鏡下での観察で確認す
ることができる。特性の変化としては、足場依存性、サイトカイン依存応答性、
ホルモン依存性、薬剤耐性、細胞運動性、細胞遊走活性、拍動性、細胞内物質の
変化等を用いることができる。細胞運動性としては、細胞浸潤活性、細胞遊走活
20 性がある。また、細胞内物質の変化としては例えば、酵素活性、mRNA量、Ca²⁺やcA
MP等の細胞内情報伝達物質量、細胞内蛋白質量等を用いることができる。また、
受容体の刺激によって誘導される細胞の増殖活性の変化を指標とすることでき
る。組織系の指標としては、使用する組織に応じた機能変化を検出指標とす
ることができる。生体系の指標としては組織重量変化、血液系の変化、例えば血球細
25 胞数の変化、タンパク質量や、酵素活性、電解質質量の変化、また、循環器系の変
化、例えば、血圧、心拍数の変化等を用いることができる。

- 11 -

これらの検出指標を測定する方法としては、特に制限はなく、発光、発色、蛍光、放射活性、蛍光偏光度、表面プラズモン共鳴シグナル、時間分解蛍光度、質量、吸収スペクトル、光散乱、蛍光共鳴エネルギー移動等を用いることができる。これらの測定方法は当業者にとっては周知であり、目的に応じて、適宜選択する

5 ことができる。例えば、吸収スペクトルは一般的に用いられるフォトメータやプレートリーダ等、発光はルミノメータ等、蛍光はフルオロメータ等で測定することができる。質量は質量分析計を用いて測定することができる。放射活性は、放射線の種類に応じてガンマカウンターなどの測定機器を用いて、蛍光偏光度はBEACON（宝酒造）、表面プラズモン共鳴シグナルはBIACORE、時間分解蛍光、蛍光共

10 鳴エネルギー移動などはARVOなどにより測定できる。さらに、フローサイトメータなども測定に用いることができる。本発明においては、変異受容体の細胞外領域と他のタンパク質の細胞内領域を含むキメラ受容体を用いることも可能である。

15 例えば、G-CSF受容体、EPO受容体、EGF受容体、トロンボポイエチン受容体の細胞内領域を用い、これらの受容体の刺激によって誘導される細胞増殖活性を検出指標とすることができます。また、細胞増殖活性を検出指標として測定する場合、検出感度を上げることを目的として、リガンドの非存在下では死滅する細胞株が好ましく、特に、継代が容易である点でサイトカイン依存性細胞株が好ましい。例えば、IL-2依存性細胞株であるCTLL-2細胞や、IL-3依存性細胞株である32D細胞、FDC-P1細胞、Ba/F3細胞を用いることができる。これらの細胞株は、IL-2あるいはIL-3等の増殖に必要なサイトカインを培養液から除去することで、培養開始2日目か3日目には細胞が死滅する特徴を有する。マウスG-CSF受容体細胞内領域を有するキメラ受容体を発現させたFDC-P1細胞やBa/F3細胞を用いることが好ましい。

20 本発明のアゴニスト活性を有するリガンドは、変異受容体に対してアゴニスト活性を有していれば特に限定されず、変異受容体と非変異受容体の両方にアゴニスト活性を有していてもよいし、変異受容体のみにアゴニスト活性を有していてもよい。変異受容体と非変異受容体の両方に対してアゴニスト活性を有する場合

- 12 -

には、非変異受容体に対してより高いアゴニスト活性を有していてもよいし、変異受容体に対してより高いアゴニスト活性を有していてもよい。又、非変異受容体と変異受容体に対して、同程度のアゴニスト活性を有していてもよい。しかしながら、変異受容体に起因する疾患の治療が主目的である場合には、
5 非変異受容体と比較して、変異受容体において高いアゴニスト活性を有するリガンドを用いることが好ましい。

本発明の抗体は、アゴニスト活性を有する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ラクダ抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。抗体は、ポリクローナル抗体であっても
10 モノクローナル抗体であってもよいが、均質な抗体を安定に生産できる点でモノクローナル抗体が好ましい。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は当業者に周知の方法により作製することができる。

モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体產生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングすることによって作製できる。

感作抗原としては特に限定されないが、例えば、目的の受容体の全長タンパク質や、部分ペプチド（例えば、細胞外領域）などを用いることができる。抗原の調製は、当業者に公知の方法により行うことができ、例えば、バキュロウイルスを用いた方法（例えば、W098/46777など）などに準じて行うことができる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol., 1981, 73, 3-46.) 等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。また、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニング

- 1 3 -

し、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて產生させた遺伝子組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A.K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。具体的には、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成する。目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。本発明の抗体の認識する分子上のエピトープは特定のものに限定されず、分子上に存在するエピトープならばどのエピトープを認識してもよいが、通常、細胞外領域に存在するエピトープを認識する。本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト化（Humanized）抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し產生させることにより得ることができる。ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR； complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region； FR）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように

- 14 -

作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し產生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 2394 00、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856.）。また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-598 78参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照）。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を適當な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方は既に周知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。抗体遺伝子を一旦単離し、適當な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適當な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いることができる。動物細

- 15 -

胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney) 、HeLa、Vero、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコティアナ (*Nicotiana*) 属、例えばニコティアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。
5 真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などが知られている。原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる產生
10 系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*) 、枯草菌が知られている。これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。

また、抗体は抗原に結合することができれば、低分子化抗体や抗体の修飾物などであってもよい。本発明において低分子化抗体とは、全長抗体 (whole antibody、
15 例えばwhole IgG等) の一部分が欠損している抗体断片を含み、抗原への結合能を有していれば特に限定されない。本発明の抗体断片は、全長抗体の一部分であれば特に限定されないが、重鎖可変領域 (VH) 又は軽鎖可変領域 (VL) を含んでいいることが好ましく、特に好ましいのは VH と VL の両方を含む断片である。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、scFv (シングルチェインF
20 v)などを挙げることができるが、好ましくは scFv (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883, Plickthun 「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」 Vol. 113, Resenburg及びMoore編, Springer Verlag, New York, pp. 269-315, (1994)) である。このような抗体断片を得るには、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで処理し抗体断片を生成させるか、
25 又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい (例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol.

- 1 6 -

munol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. 5 and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。本発明における低分子化抗体は、全長抗体よりも分子量が小さくなることが好ましいが、例えば、ダイマー、トリマー、テトラマーなどの多量体を形成すること等もあり、全長抗体よりも分子量が大きくなることもある。

本発明において好ましい低分子化抗体は、抗体のVHを2つ以上及びVLを2つ以上含み、これら各可変領域を直接あるいはリンカー等を介して間接的に結合した抗体である。結合は、共有結合でも非共有結合でもよく、また、共有結合と非共有結合の両方でよい。さらに好ましい低分子化抗体は、VHとVLが非共有結合により結合して形成されるVH-VL対を2つ以上含んでいる抗体である。この場合、低分子化抗体中的一方のVH-VL対と他方のVH-VL対との間の距離が、全長抗体における距離よりも短くなる抗体が好ましい。
15

本発明において特に好ましい低分子化抗体はダイアボディ (Diabody) 又はsc (Fv) 2である。ダイアボディは、可変領域と可変領域をリンカー等で結合したフラグメント（例えば、scFv等）（以下、ダイアボディを構成するフラグメント）を2つ結合させて二量体化させたものであり、通常、2つのVLと2つのVHを含む (P. Holliger 20 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6444-6448 (1993)、EP404097号、W093/1 1161号、Johnson et al., Methods in Enzymology, 203, 88-98, (1991)、Holliger et al., Protein Engineering, 9, 299-305, (1996)、Perisic et al., Structure, 2, 1217-1226, (1994)、John et al., Protein Engineering, 12(7), 597-604, (1999)、Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90, 6444-6448, (19 25 93)、Atwell et al., Mol. Immunol. 33, 1301-1312, (1996))。ダイアボディを構成するフラグメント間の結合は非共有結合でも、共有結合でよいが、好ましくは

非共有結合である。

また、ダイアボディを構成するフラグメント同士をリンカーなどで結合して、一本鎖ダイアボディ（scDiabody）とすることも可能である。その際、ダイアボディを構成するフラグメント同士を20アミノ酸程度の長いリンカーを用いて結合す

5 ると、同一鎖上に存在するダイアボディを構成するフラグメント同士で非共有結合が可能となり、二量体を形成する。

ダイアボディを構成するフラグメントは、VLとVHを結合したもの、VLとVLを結合したもの、VHとVHを結合したもの等を挙げることができるが、好ましくはVHとV

Lを結合したものである。ダイアボディを構成するフラグメント中において、可変領域と可変領域を結合するリンカーは特に制限されないが、同一フラグメント中の可変領域の間で非共有結合がおこらない程度に短いリンカーを用いることが好ましい。そのようなリンカーの長さは当業者が適宜決定することができるが、通常2～14アミノ酸、好ましくは3～9アミノ酸、特に好ましくは4～6アミノ酸である。この場合、同一フラグメント上にコードされるVLとVHとは、その間の

15 リンカーが短いため、同一鎖上のVLとVHの間で非共有結合がおこらず、単鎖V領域フラグメントが形成されない為、他のフラグメントとの非共有結合による二量体を形成する。さらに、ダイアボディ作製と同じ原理で、ダイアボディを構成するフラグメントを3つ以上結合させて、トリマー、テトラマーなどの多量体化させた抗体を作製することも可能である。

20 また、本発明におけるsc(Fv)2は、2つのVH及び2つのVLをリンカー等で結合して一本鎖にした低分子化抗体である (Hudson et al, J Immunol. Methods 1999 ; 231 : 177-189)。sc(Fv)2は、全長抗体や他の低分子化抗体と比較して、特に高いアゴニスト活性を示す。sc(Fv)2は、例えば、scFvをリンカーで結ぶことによって作製できる。

25 また2つのVH及び2つのVLが、一本鎖ポリペプチドのN末端側を基点としてVH、VL、VH、VL（[VH] リンカー [VL] リンカー [VH] リンカー [VL]）の順に並ん

- 18 -

でいることを特徴とする抗体が好ましい。

2つのVHと2つのVLの順序は特に上記配置に限定されず、どのような順序で並べられていてもよい。例えば以下のような、配置も挙げることができる。

[VL] リンカー [VH] リンカー [VH] リンカー [VL]

5 [VH] リンカー [VL] リンカー [VL] リンカー [VH]

[VH] リンカー [VH] リンカー [VL] リンカー [VL]

[VL] リンカー [VL] リンカー [VH] リンカー [VH]

[VL] リンカー [VH] リンカー [VL] リンカー [VH]

抗体の可変領域を結合するリンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任

10 意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー（例えば、Protein Engineering,

9(3), 299-305, 1996参照）に開示されるリンカー等を用いることができるが、本

発明においてはペプチドリンカーが好ましい。ペプチドリンカーの長さは特に限

定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、通常、1～

100アミノ酸、好ましくは3～50アミノ酸、更に好ましくは5～30アミノ酸、特に好

15 ましくは12～18アミノ酸（例えば、15アミノ酸）である。

例えば、ペプチドリンカーの場合：

Ser

Gly · Ser

Gly · Gly · Ser

20 Ser · Gly · Gly

Gly · Gly · Gly · Ser

Ser · Gly · Gly · Gly

Gly · Gly · Gly · Gly · Ser

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly

25 Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly

- 19 -

Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly

(Gly · Gly · Gly · Gly · Ser) n

(Ser · Gly · Gly · Gly) n

5 [nは1以上の整数である] 等を挙げることができる。但し、ペプチドリンカーの長さや配列は目的に応じて当業者が適宜選択することができる。

よって本発明において特に好ましいsc(Fv)2の態様としては、例えば、以下のsc(Fv)2を挙げができる。

[VH] ペプチドリンカー(15アミノ酸) [VL] ペプチドリンカー(15アミノ酸)

10 [VH] ペプチドリンカー(15アミノ酸) [VL]

合成化学物リンカー(化学架橋剤)は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、ジスクシンイミジルスペレート(DSS)、ビス(スルホスクシンイミジル)スペレート(BS³)、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(DSP)、ジチオビス(スルホスクシンイミ

15 ジルプロピオネート)(DTSSP)、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)(EGS)、エチレングリコールビス(スルホスクシンイミジルスクシネート)(スルホ-EGS)、ジスクシンイミジル酒石酸塩(DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩(スルホ-DST)、ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(BSOCOES)、ビス[2-(スルホスクシンイミドオ

20 キシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(スルホ-BSOCOES)などであり、これらの架橋剤は市販されている。

4つの抗体可変領域を結合する場合には、通常、3つのリンカーが必要となるが、全て同じリンカーを用いてもよいし、異なるリンカーを用いてもよい。本発明において好ましい低分子化抗体はダイアボディ又はsc(Fv)2である。このような低分子化抗体を得るには、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで処理し、抗体断片を生成させるか、又はこれら抗体断片をコードするDNAを構築し、これを

- 2 0 -

発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976；Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496；Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515；Lamoyi, E., Methods Enzymol.

5 (1986) 121, 652-663；Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669；Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。

全長抗体を低分子化することにより、非常に高いアゴニスト活性を有する抗体を作製することが可能である。

10 抗体の修飾物として、ポリエチレンギリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。又、抗体に放射性同位元素、化学療法剤、細菌由来トキシン等の細胞傷害性物質などを結合することも可能である。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

15 さらに、本発明で使用される抗体は二重特異性抗体(bispecific antibody)であってもよい。二重特異性抗体はある分子上の異なるエピトープを認識する抗原結合部位を有する二重特性抗体であってもよいし、一方の抗原結合部位がある分子を認識し、他方の抗原結合部位が放射性物質、化学療法剤、細胞由来トキシン等の細胞障害性物質を認識してもよい。この場合、ある分子を発現している細胞に直接細胞障害性物質を作用させ腫瘍細胞に特異的に障害を与え、腫瘍細胞の増殖を抑制することが可能である。二重特異性抗体は2種類の抗体のHL対を結合させて作製することもできるし、異なるモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを融合させて、二重特異性抗体產生融合細胞を作製し、得ることもできる。さらに、遺伝子工学的手法により二重特異性抗体を作製することも可能である。

25 又、本発明においては、糖鎖を改変した抗体などを用いることも可能である。抗体の糖鎖改変技術は既に知られている（例えば、WO00/61739、WO02/31140な

- 21 -

ど)。

本発明における「抗体」にはこれらの抗体も包含される。

前記のように発現、產生された抗体は、通常のタンパク質の精製で使用されて
いる公知の方法により精製することができる。例えば、プロテインAカラムなどの
5 アフィニティーカラム、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩
析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製するこ
ができる (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring
Harbor Laboratory, 1988)。

抗体の抗原結合活性 (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lan
10 e, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) の測定には公知の手段を使用するこ
ができる。例えば、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、
RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光免疫法などを用いることができる。

また本発明は、変異受容体に対してアゴニスト活性を有するリガンドのスクリ
ーニング方法を提供する。本方法においては、まず、変異受容体に被検物質（被
15 検化合物）を接触させる。変異受容体への被検物質の「接触」は、通常、変異受
容体を発現する細胞の培養液もしくは抽出液に被検物質を添加することによって
行うが、この方法に限定されない。被検物質がタンパク質等の場合には、該タン
パク質を発現するDNAベクターを、該細胞へ導入することにより、「接触」を行
うことができる。

20 本方法においては次いで変異受容体におけるシグナルを検出する。シグナルの
検出には、上記した方法を用いることができる。

本方法においては次いで、被検物質を接触させない場合（対照）と比較して、
アゴニスト活性を有するリガンドを選択する。このようにして選択されたリган
ドは、受容体の欠損あるいは変異に関連する疾患の治療または予防のための治療
25 薬となることが期待される。

本発明のスクリーニング方法の別の態様としては、まず正常受容体に対し、被

- 22 -

検物質を接触させ、アゴニスト活性を測定する。次いで、変異受容体に対し、同じく被検物質を接触させ、アゴニスト活性を測定する。そして、正常受容体に接触させた場合と比較して、変異受容体に接触させた場合において高いアゴニスト活性を有するリガンドを選択する。

5 さらに本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、まず、正常受容体に對し、被検物質を接触させ、アゴニスト活性を測定する。次いで、変異受容体に對し、同じく被検物質を接触させ、アゴニスト活性を測定する。そして、正常受容体と変異受容体の両方の場合にアゴニスト活性を有するリガンドを選択する。

上記方法におけるアゴニスト活性の測定は、上述の方法によって行うことができる。
10

本発明の上記スクリーニング方法によって取得される物質（化合物）もまた、本発明に含まれる。

本発明のリガンド（例えば、抗体）はアゴニスト活性を有することから、該り
15 ガンドが作用する受容体の欠損や変異による反応性低下に起因する疾患に対して、
有効な治療薬となることが期待される。即ち本発明は、本発明の上記リガンドを
含有する、変異受容体に起因する疾患の治療薬を提供する。上記の代表的な疾患
として、例えば、血小板減少症や、2型糖尿病、Laron症候群を挙げることができる。

本発明における疾患としては、先天性無巨核球性血小板減少症 (Congenital ame
20 gakaryocytic thrombocytopenia; CAMT) を好適に示すことができる。

本発明のリガンド、または本発明のスクリーニング方法によって取得される物
質（化合物）を医薬組成物として用いる場合には、当業者に公知の方法で製剤化
することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、
エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以
25 外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口
的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、

- 23 -

滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適當な容量が得ら
5 れるようにするものである。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターク、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターク、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのよう
10 な甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。

調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含
15 む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM) 、HCO-50と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適當なアンプルに充填させる。

投与は経口、非経口投与のいずれでも可能であるが、好ましくは非経口投与で
25 あり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内

- 2 4 -

注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量としては、例えば、一回につき体重1
5 kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001～100000mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することができる
る。

10

図面の簡単な説明

図1は、pCOS2-hMPLfullベクターの構成を示す図である。

図2は、pCOS2-hMPLfullG305Cベクターの構成を示す図である。

図3は、pBACsurf1-hMPL-FLAGベクターの構成を示す図である。

15 図4は、pCOS2-HA-Ba/F3の各ダイアボディとhTP0に対するアゴニスト活性を示す図である。縦軸は、O.D. 450/655nmを示し、横軸は濃度を示す。

図5は、hMPL-Ba/F3の各ダイアボディとhTP0に対するアゴニスト活性を示す図である。縦軸は、O.D. 450/655nmを示し、横軸は濃度を示す。

20 図6は、hMPL(G305C)-Ba/F3の各ダイアボディとhTP0に対するアゴニスト活性を示す図である。縦軸は、O.D. 450/655nmを示し、横軸は濃度を示す。

図7は、pCOS2-hMPLfullC769Tベクターの構成を示す図である。

図8は、pCOS2-hMPLfullC823Aベクターの構成を示す図である。

図9は、TA136 sc(Fv)2遺伝子構築を表す図である。

図10は、pCXND3-TA136 sc(Fv)2ベクターの構成を示す図である。

25 図11は、hMPL-Ba/F3細胞におけるTA136 db、TA136 sc(Fv)2のアゴニスト活性を示す図である。縦軸はO.D. 450/655nmを示し、横軸は濃度を示す。

- 25 -

図12は、hMPL (G305C)-Ba/F3細胞におけるTA136 db、TA136 sc (Fv) 2のアゴニスト活性を示す図である。縦軸はO. D. 450/655nmを示し、横軸は濃度を示す。

図13は、hMPL (C769T)-Ba/F3細胞におけるTA136 db、TA136 sc (Fv) 2のアゴニスト活性を示す図である。縦軸はO. D. 450/655nmを示し、横軸は濃度を示す。

5 図14は、hMPL (C823A)-Ba/F3細胞におけるTA136 db、TA136 sc (Fv) 2のアゴニスト活性を示す図である。縦軸はO. D. 450/655nmを示し、横軸は濃度を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制
10 限されるものではない。

[実施例1] Ba/F3細胞株の樹立

CAMT患者に見られるトロンボポイエチン受容体遺伝子変異のうちG305C (R102P) 変異を持つ患者が複数報告されている。そこで、以下の方法でG305C (R102P)
15 変異を持つトロンボポイエチン受容体遺伝子の発現ベクターを構築し、Ba/F3細胞に導入した。正常なトロンボポイエチン受容体遺伝子（配列番号：1）および該遺伝子の開始コドンから305番目の塩基をGからCに置換した遺伝子（配列番号：3）を作製した。これらのDNA断片を制限酵素EcoRI、SalIで切断し、動物細胞発現用ベクターpCOS2-HaのEcoRI、SalIサイトに導入し、pCOS2-hMPLfull（図1）、
20 およびpCOS2-hMPLfullG305C（図2）を作製した。

pCOS2-hMPLfull、pCOS2-hMPLfullG305C、およびネガティブコントロールとしてpCOS2-HaをpVII処理後、それぞれ20 μgをBa/F3細胞に以下の条件でトランスフェクトした。GENE PULSER II (BIO-RAD) を用い、1x10⁷ cells/ml in PBS、Gene Pulser Cuvette 0.4cm、0.33kV、950 μFの条件で遺伝子導入した後、培地をRPMI1640、10% FBS、1ng/ml rmIL3 (Pepro tech)、500 μg/ml Geneticin (GIBCO)、100 unit/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシンにかえて細胞を選抜した。

- 26 -

その結果、それぞれのベクターからhMPL-Ba/F3細胞、hMPL (G305C)-Ba/F3細胞、pCOS2-HA-Ba/F3細胞株が得られた。

[実施例 2] トロンボポイエチン受容体細胞外ドメインタンパクの調製

5 抗トロンボポイエチン受容体抗体作製用抗原調製のため、ヒトトロンボポイエチ
ン受容体の細胞外ドメインを昆虫細胞Sf9で分泌生産する系を以下のように構築
した。ヒトトロンボポイエチン受容体の細胞外ドメイン (Gln26-Trp491) の下流
にFLAGタグを付加した遺伝子を作製し、pBACsurf-1 (Novagen) のPstI-SmaIサイ
トに挿入し、pBACsurf1-hMPL-FLAG (図3) を作成した。その結果、バキュロウイ
10 ルスのgp64タンパクの分泌シグナル配列を用いてトロンボポイエチン受容体の細
胞外ドメインを分泌しうる遺伝子が構築された (配列番号: 5)。Bac-N-Blue Tr
ansfection Kit (Invitrogen) を用い、キット添付のプロトコールに従い、4 μg
の本ベクターをSf9細胞にトランスフェクトした。培養3日後に培養上清を回収し、
15 プラークアッセイで組換えウイルスを単離した。ウイルスストックを作成後、Sf9
細胞に感染させ、その培養上清を回収した。得られた培養上清はQ Sepharose Fast
Flow (ファルマシア) に吸着させた後、500mM NaCl、0.01% Tween-20を含むPBS
で溶出し、M2 Affinity Resin (Sigma) に吸着させた。100mM Glycine-HCl、0.0
20 1% Tween20 (pH3.5) で溶出後、直ちに1M Tris-HCl (pH8.0) により中和し、Super
dex 200 26/60によりゲルろ過クロマトを行い精製した (0.01% Tween20を含むPBS
溶液)。

[実施例 3] 抗トロンボポイエチン受容体抗体ダイアボディの作製

精製されたTPOR細胞外ドメインタンパク質を初回免疫100 μg、2回目以降50 μg
ずつ計7回MRL/lprマウスに免疫し、定法に従いP3-X63-Ag8-U1 (P3U1) 細胞との
25 ハイブリドーマを作製した。精製タンパクを用いたELISAアッセイで抗トロンボポ
イエチン受容体抗体を産生するハイブリドーマ細胞を選択した (VB08B、VB45B、V

- 27 -

B033、VB140、VB157)。

一方、hMPL-Ba/F3細胞をBalb/Cマウスに 1.0×10^7 細胞ずつ1週間から5ヶ月の間隔で腹腔内投与し、計11回免疫後、同様にハイブリドーマを作製し、抗トロンボポイエチン受容体抗体を產生するハイブリドーマを選択した(TA136)。

5 得られた各ハイブリドーマ細胞から抗体cDNAの可変領域をH鎖、L鎖それぞれクローニングし塩基配列を決定した。決定した塩基配列に基づきC末端にFLAGタグの付いたダイアボディ遺伝子(VB08B db、VB45B db、VB033 db、VB140 db、VB157 db、TA136 db)を設計し、動物細胞発現用ベクターpCXND3に導入した(pCXND3-VB08B db、pCXND3-VB45B db、pCXND3-VB033 db、pCXND3-VB140 db、pCXND3-VB157 db、pCXND3-TA136 db)。作製された各ベクターをCOS7細胞に導入し、その培養上清を
10 培養3日目に回収した。得られた培養上清中のダイアボディ濃度はM2抗体(Sigma)を用いたBIACore(ファルマシア)で定量した。

[実施例4] Ba/F3細胞株のダイアボディ依存性アッセイ

15 pCOS2-HA-Ba/F3細胞、hMPL_Ba/F3細胞、hMPL(G305C)-Ba/F3細胞のそれぞれを、 2.0×10^5 cells/mlになるように培地(RPMI1640、10% FBS、100unit/mlペニシリン、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン)に希釈し、 $60 \mu\text{l}/\text{well}$ で96well plateに分注した。hTPO(R&D、終濃度 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにCHO-S-SFM IIで調整)とdiabody/COS7 sup(VB08B db、VB45B db、VB033 db、VB140 db、VB157 db、TA136 db、
20 それぞれx1, x3, x9, x27, x81, x243にCHO-S-SFM IIで調整)を $40 \mu\text{l}/\text{well}$ で分注して24時間培養した後、 $10 \mu\text{l}/\text{well}$ でCell Count Reagent(ナカライト)を加え、2時間培養後にO.D. 450/655nm測定した。その結果、hMPL(G305C)-Ba/F3細胞ではhTPOや他のアゴニスト抗体に対する反応性が著しく低下していた。しかし、正常なレセプターを発現するhMPL_Ba/F3細胞に対するアゴニスト活性の弱いTA136 db(配列番号:7)は、hMPL(G305C)-Ba/F3細胞に対して強いアゴニスト活性を示した(図4~6)。

- 28 -

なお、配列番号：8のアミノ酸番号49～54が重鎖CDR1に、69～84が重鎖CDR2に、117～123が重鎖CDR3に、163～174が軽鎖CDR1に、190～196が軽鎖CDR2に、229～237が軽鎖CDR3に相当する。

5 [実施例5] Ba/F3細胞株の樹立（2）

実施例1と同様CAMT患者に見られるトロンボポイエチン受容体遺伝子変異のうちC769T (R257C)、およびC823A (P275T) 変異を持つトロンボポイエチン受容体遺伝子の発現ベクターをそれぞれ構築し、Ba/F3細胞に導入した。トロンボポイエチン受容体遺伝子（配列番号：1）の開始コドンから769番目の塩基をCからTに置換した遺伝子（配列番号：9）、および823番目の塩基をCからAに置換した遺伝子（配列番号：11）を作製した。これらのDNA断片を制限酵素EcoRI、SalIで切斷し、動物細胞発現用ベクターpCOS2-HaのEcoRI、SalIサイトに導入し pCOS2-hMPLfullC769T（図7）、およびpCOS2-hMPLfullC823A（図8）を作製した。

pCOS2-hMPLfullC769T、pCOS2-hMPLfullC823Aをpvu I処理後、それぞれ20 μgをBa/F3細胞に以下の条件でトランスフェクトした。GENE PULSER II (BIO-RAD) を用い、1x10⁷ Cells/ml in PBS、Gene Pulser Cuvette 0.4cm、0.33kV、950 μFの条件で遺伝子導入した後、培地をRPMI1640、10% FBS、1ng/ml rmIL3 (Pepro tech)、500 μg/ml Geneticin (GIBCO)、100unit/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマジシンにかえて細胞を選抜した。その結果、それぞれのベクターからhMPL (C769T)-Ba/F3細胞、hMPL (C823A)-Ba/F3細胞株が得られた。

[実施例6] 抗トロンボポイエチン受容体抗体sc(Fv) 2の作製

前述のpCXND3-TA136 dbを用いて以下の手法によりTA136 sc(Fv) 2遺伝子を構築した。（図9）。

25 プライマーA (TAGAATTCCACCATGAGAGTGCTGATTCTTGTGGCTGTTCACAGCCTTCCTGGTA CCCTGTCTGATGTGCAGCTGCAGG／配列番号：15）とプライマーB (TGGGTGAGAACAAATT

- 2 9 -

GCGATCCGCCACCACCCGAACCACCACCAACCCGAACCACCCACCTGAGGAGACGGTGACTGAGG／配列番号：16）の組み合わせ、およびプライマーC（CAGTCACCGTCTCCTCAGGTGGTGGTGG

TTGGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGATGCAAATTGTTCTACCCAGTC／配列番号：17）

とプライマーD（ATTGCGGCCGCTTATCACTTATCGTCGTATCCTTGTAGTCTTGATTTCCAGCTTGG

5 TG／配列番号：18）の組み合わせでそれぞれPCRを行い、それぞれの産物の混合物をテンプレートとし、プライマーAとプライマーDで再びPCRを行った。得られた約800bpのDNA断片を制限酵素EcoRI、およびNotIで消化し、pBacPAK9（CLONTECH社製）にクローニングし、pBacPAK9-scTA136を作製した。

次に、pBacPAK9-scTA136をテンプレートとし、プライマーE（GATGTGCAGCTGCAGG
10 AGTCGGGAC／配列番号：19）とプライマーF（CCTGCAGCTGCACATCCGATCCACCGCCTCC
CGAACCAACCACCCGATCCACCACCTCCTTGATTTCCAGCTTGGTGC／配列番号：20）でPCR
を行い、約800bpのDNA断片をpGEM-T Easyベクター（Promega社製）へクローニングした。

塩基配列の確認後、制限酵素PvuIIで消化し、得られた約800bpのDNA断片をpBac
15 PAK9-scTA136のPvuIIサイトに挿入し、pBacPAK9-TA136 sc (Fv) 2を作製した。作製
したベクターを制限酵素EcoRIおよびNotIで消化し、約1600bpのDNA断片を発現ベ
クターpCXND3にクローニングし、pCXND3-TA136 sc (Fv) 2を作製した（配列番号：
13）（図10）。

20 [実施例7] TA136 dbおよびTA136 sc (F) 2のTP0様アゴニスト活性の評価

pCXND3-TA136 db、およびpCXND3-TA136 sc (Fv) 2をCOS7細胞に導入し、それぞれ
の培養上清を培養3日目に回収した。得られた培養上清中のDiabody濃度はM2抗体
(Sigma) を用いたBIACore（ファルマシア）で定量した。

hMPL-Ba/F3細胞、hMPL (G305C)-Ba/F3細胞、hMPL (C769T)-Ba/F3細胞、hMPL (C823
25 A)-Ba/F3細胞のそれぞれを 4.0×10^5 cells/mlになるように培地(RPMI1640、10% FB
S、100unit/ml ペニシリン、100μg/ml ストレプトマイシン)に希釈し、60μl/we

- 3 0 -

11で96well plateに分注した。hTP0 (R&D社) と上記COS7細胞培養上清を40 μ l/we
11で分注して24時間培養した後、10 μ l/wellでCell Count Reagent (ナカライ)
を加え、2時間培養後にO.D. 450/655nm測定した。

その結果、TA136 sc (Fv) 2は、3種のトロンボポイエチン受容体変異株全てにおいて
5 hTP0やTA136 dbよりもさらに強いアゴニスト活性を示した (図12、図13、
図14)。また、正常トロンボポイエチン受容体を発現するhMPL-Ba/F3細胞においては、TA136 dbはhTP0よりも弱い活性しか示さなかつたが、sc (Fv) 2化する事により天然リガンドであるhTP0と同等のアゴニスト活性を示す事が判明した (図1
1)。

10

産業上の利用の可能性

本発明により、変異受容体に起因する疾患、例えば、CAMTの患者に対する治療
用リガンド (抗体) 、抗体をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチド
を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該抗体の製造方法が提供された。
15 さらに、該抗体をコードするポリヌクレオチドを用いた遺伝子治療の手段が提供
された。また本発明の手法は、細胞膜上のタンパク質をコードする遺伝子の変異
が原因の様々な遺伝子疾患に対する治療法を提供する。今後患者個人個人の遺伝
子診断が広く行われる事が予測されており、個人個人の遺伝子型に適合した医薬
品の開発が本発明の抗体工学技術を用いることにより可能となる。

- 31 -

請求の範囲

1. 変異受容体に対して、アゴニスト活性を有するリガンド。
2. リガンドが抗体であることを特徴とする、請求項1に記載のリガンド。
- 5 3. 変異受容体に対して、天然リガンドより高いアゴニスト活性を有することを特徴とする、請求項1または2に記載のリガンド。
4. 変異受容体が、アミノ酸配列の変異に起因する受容体であることを特徴とする、請求項1～3のいずれかに記載のリガンド。
5. 変異受容体が、天然のリガンドに対する反応性が失われていることを特徴
- 10 とする、請求項1～4のいずれかに記載のリガンド。
6. 変異受容体が疾患の原因となっている受容体であることを特徴とする、請
- 求項1～5のいずれかに記載のリガンド。
7. 変異受容体が、トロンボポイエチン受容体の変異受容体であることを特徴
- とする、請求項1～6のいずれかに記載のリガンド。
- 15 8. 抗体が低分子化抗体である、請求項2に記載のリガンド。
9. 低分子化抗体がダイアボディである、請求項8に記載のリガンド。
10. リガンドを結合させることにより変異受容体にシグナルを伝達する方法。
11. リガンドが抗体であることを特徴とする、請求項10に記載の方法。
12. 変異受容体が、アミノ酸変異に起因する受容体であることを特徴とする、
- 20 請求項10または11に記載の方法。
13. 変異受容体が、天然のリガンドに対する反応性が失われていることを特
- 徴とする、請求項10～12のいずれかに記載の方法。
14. 変異受容体が疾患の発症と関連している受容体であることを特徴とする、
- 請求項10～13のいずれかに記載の方法。
- 25 15. 変異受容体が、トロンボポイエチン受容体の変異受容体であることを特
- 徴とする、請求項10～14のいずれかに記載の方法。

- 3 2 -

16. 変異受容体にリガンドを結合させることにより、変異受容体に起因する疾患を治療する方法。

17. リガンドが抗体である、請求項16に記載の方法。

18. 以下の工程を含む、変異受容体に対してアゴニスト活性を有するリガンドのスクリーニング方法。

(a) 変異受容体に被検物質を接触させる工程、

(b) 変異受容体におけるシグナルを検出する工程、

(c) アゴニスト活性を有するリガンドを選択する工程、

19. 以下の工程を含む、変異受容体に対してアゴニスト活性を有するリガンドのスクリーニング方法。

(a) 正常受容体に対するアゴニスト活性を測定する工程、

(b) 変異受容体に対するアゴニスト活性を測定する工程、

(c) 正常受容体と比較して、変異受容体において高いアゴニスト活性を有するリガンドを選択する工程

20. 以下の工程を含む、変異受容体と正常受容体に対してアゴニスト活性を有するリガンドのスクリーニング方法

(a) 正常受容体に対するアゴニスト活性を測定する工程、

(b) 変異受容体に対するアゴニスト活性を測定する工程、

(c) 正常受容体と変異受容体の両方にアゴニスト活性を有するリガンドを選択する工程

21. リガンドが抗体である、請求項18～20のいずれかに記載のスクリーニング方法。

22. 請求項18～21のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られた物質。

23. 変異受容体に対するリガンドを含有する、変異受容体に起因する疾患の治療薬。

- 3 3 -

24. リガンドが請求項1～9のいずれかに記載のリガンドである、請求項2

3に記載の治療薬。

25. リガンドが抗体である、請求項23に記載の治療薬。

26. 変異受容体が、アミノ酸変異に起因する受容体であることを特徴とする、

5 請求項23～25のいずれかに記載の治療薬。

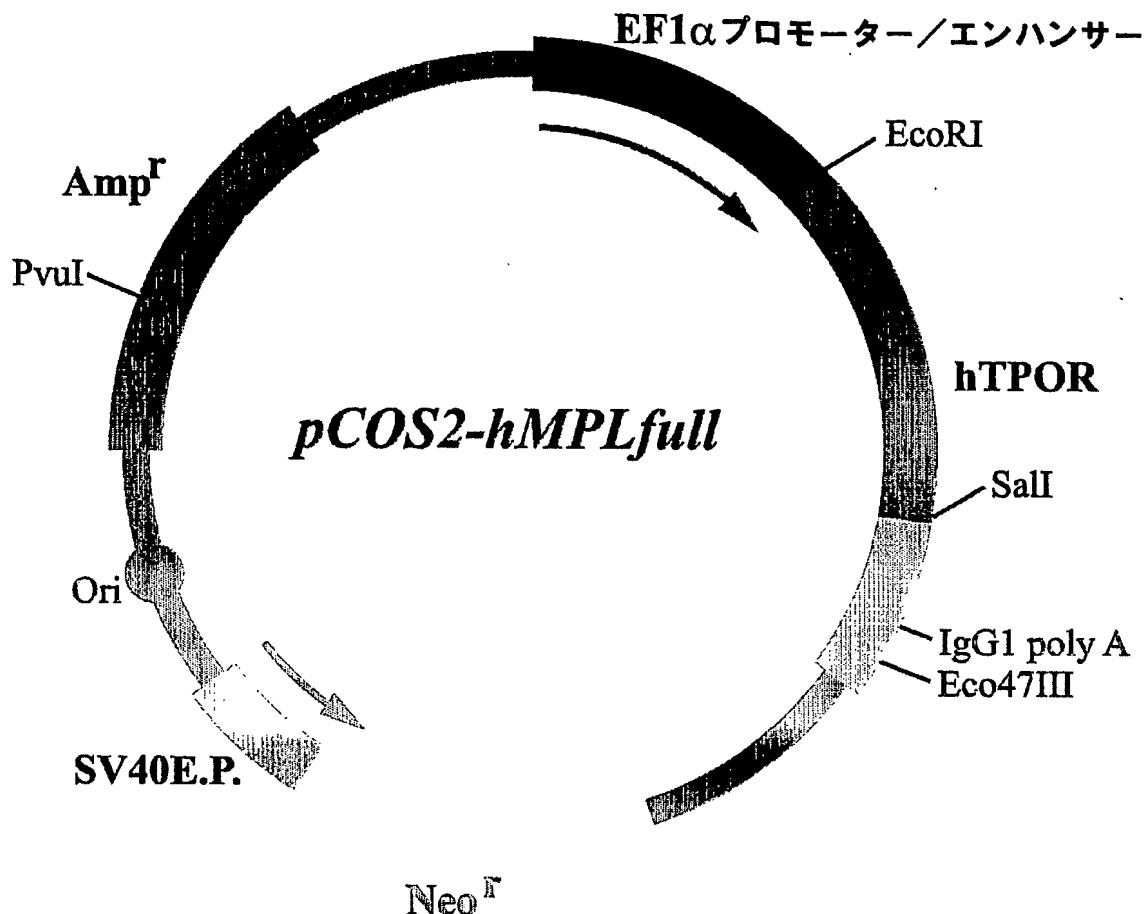
27. 変異受容体が、天然のリガンドに対する反応性が失われていることを特
徴とする、請求項23～26のいずれかに記載の治療薬。

28. 変異受容体がトロンボポイエチン受容体の変異受容体であることを特徴
とする、請求項23～27のいずれかに記載の治療薬。

10 29. 疾患が先天性無巨核球性血小板減少症である、請求項23～28のい
ずれかに記載の治療薬。

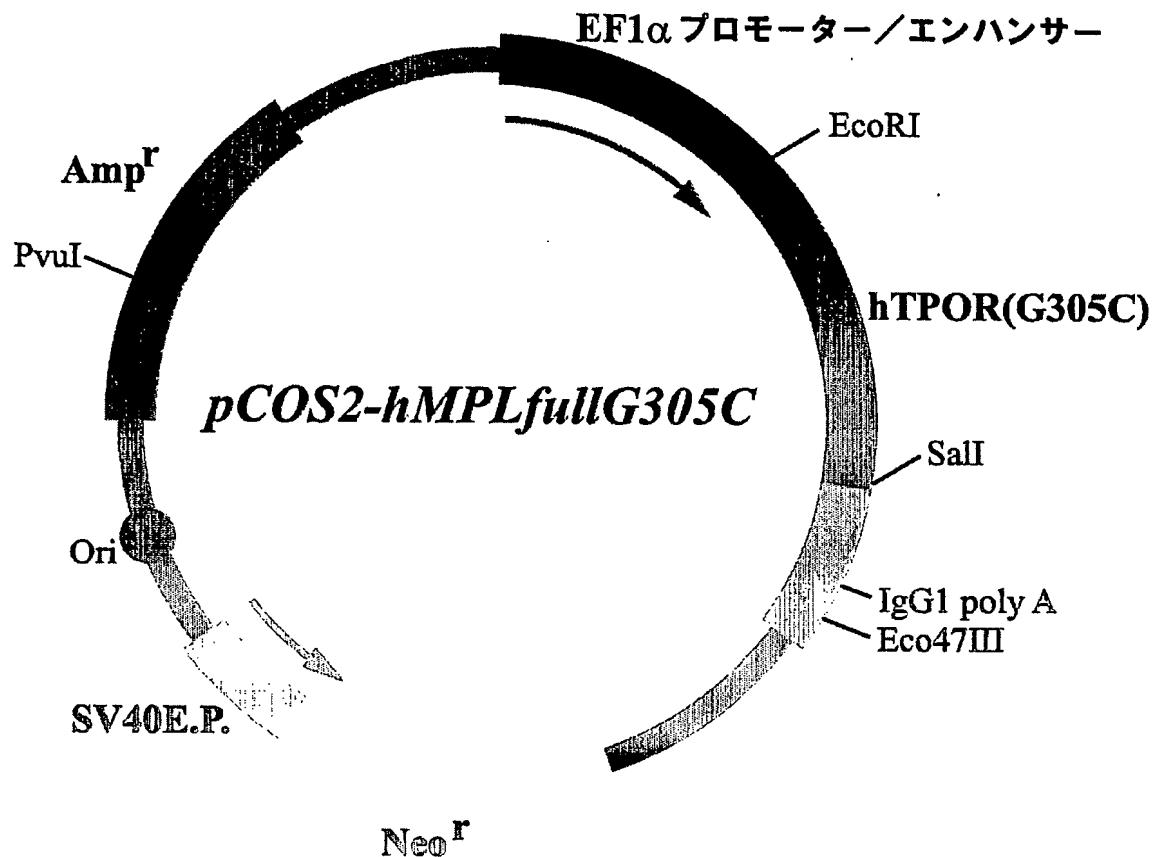
1 / 14

図 1



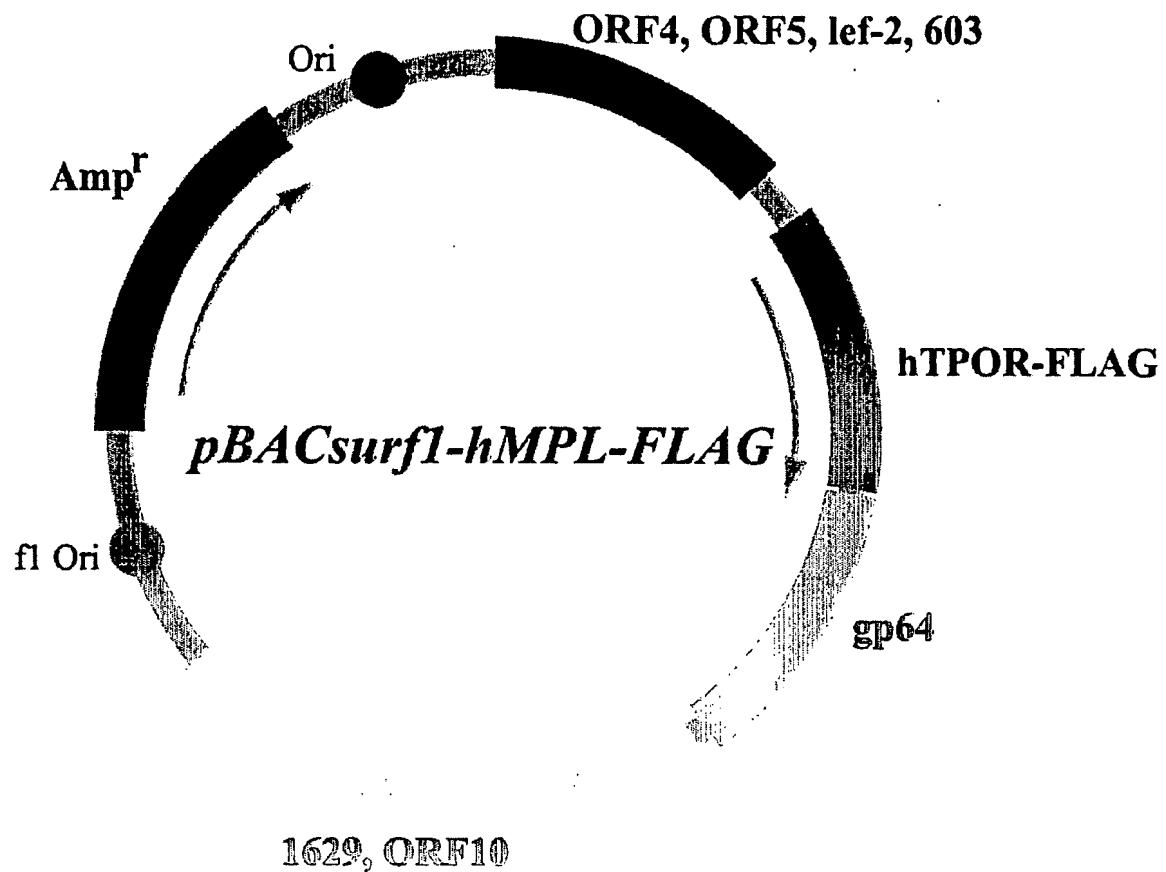
2 / 14

図 2



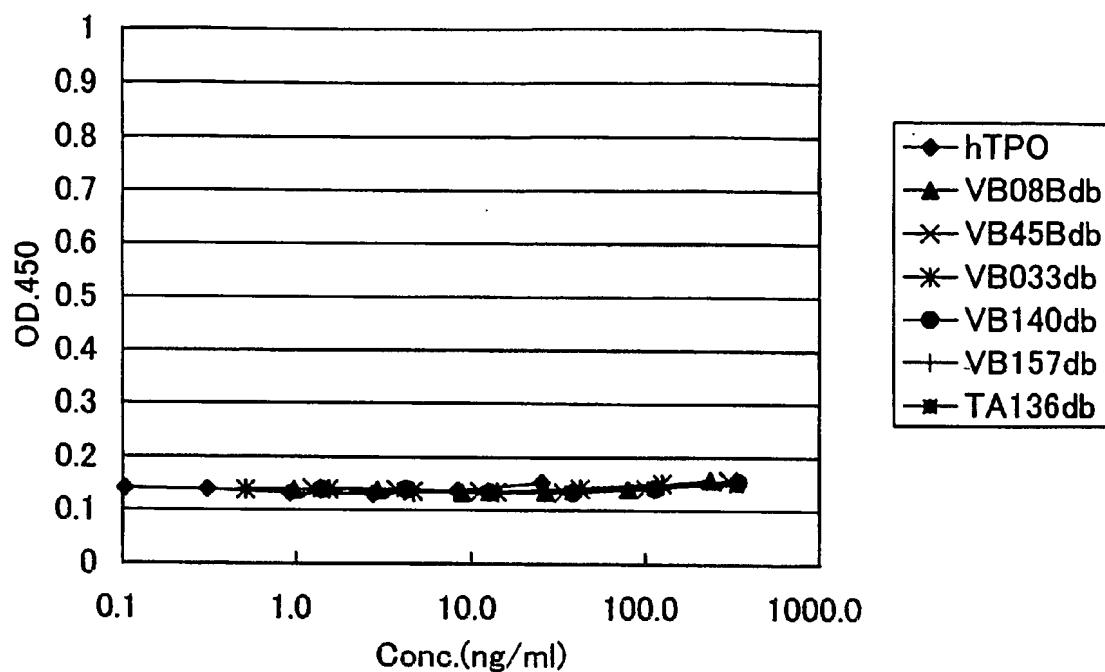
3 / 14

図 3



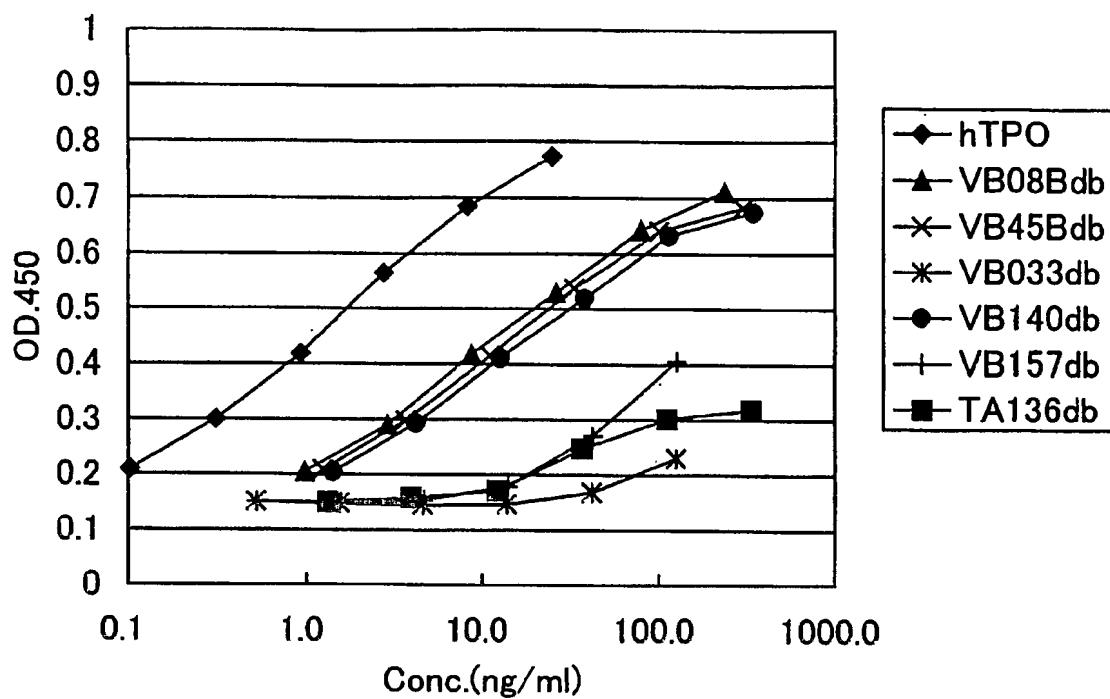
4 / 1 4

図 4



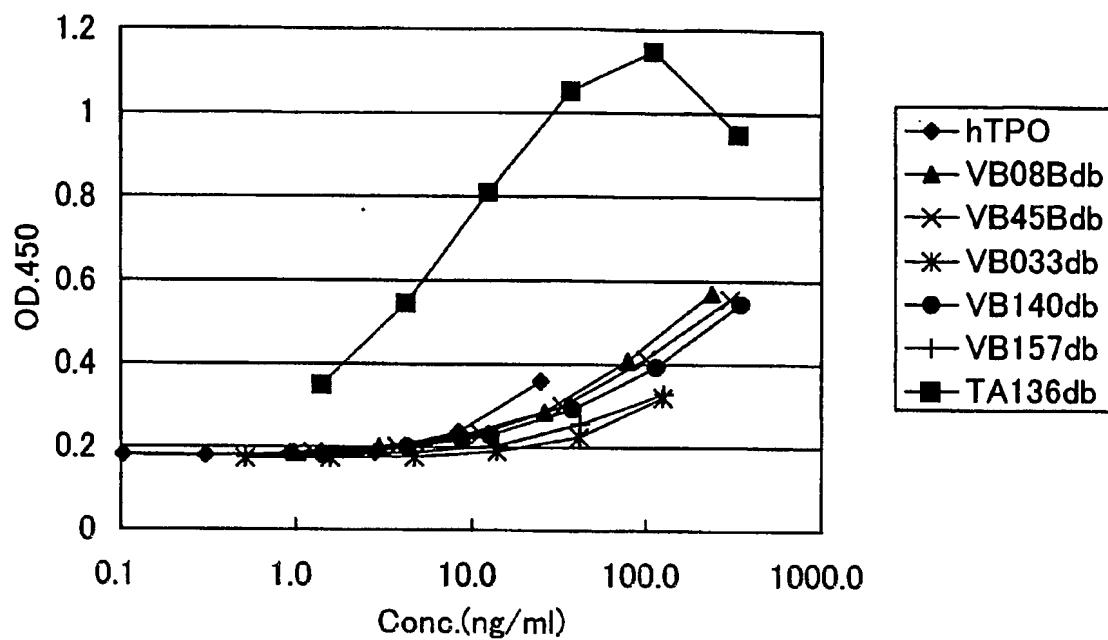
5 / 14

図 5



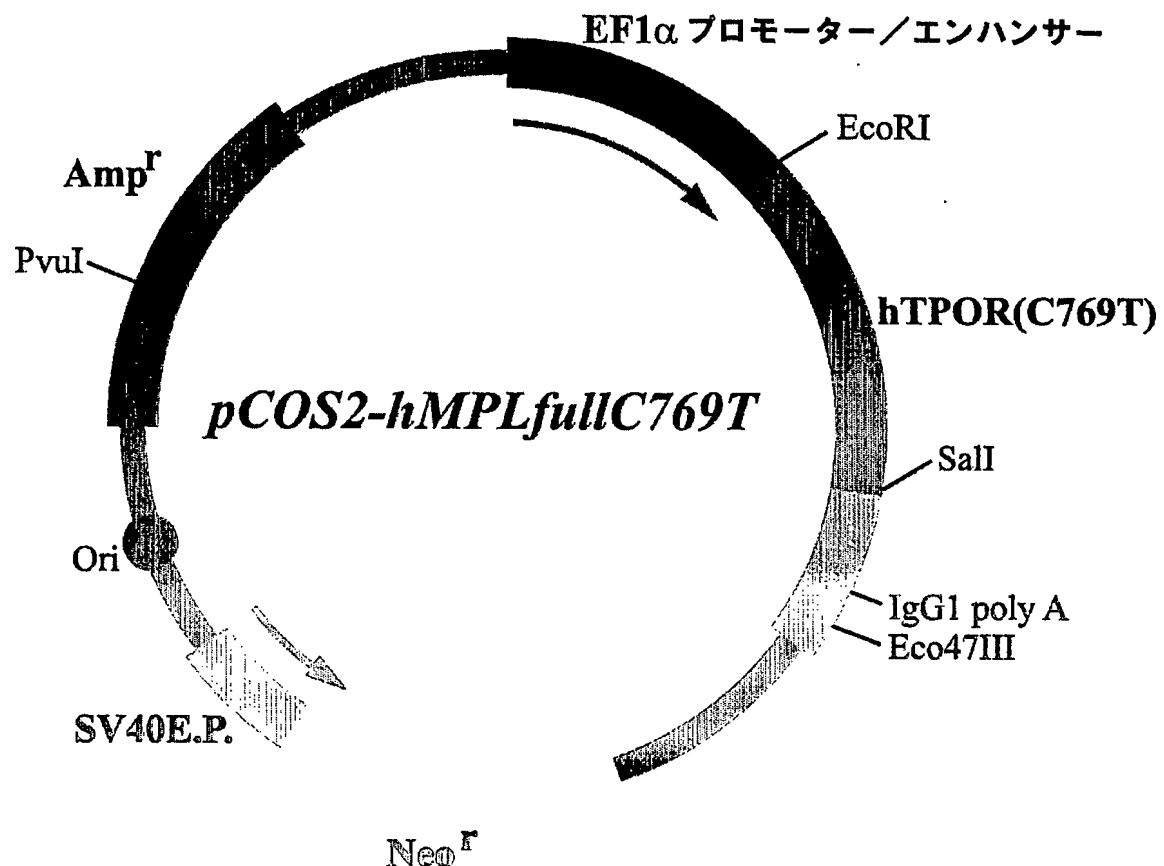
6 / 1 4

図 6



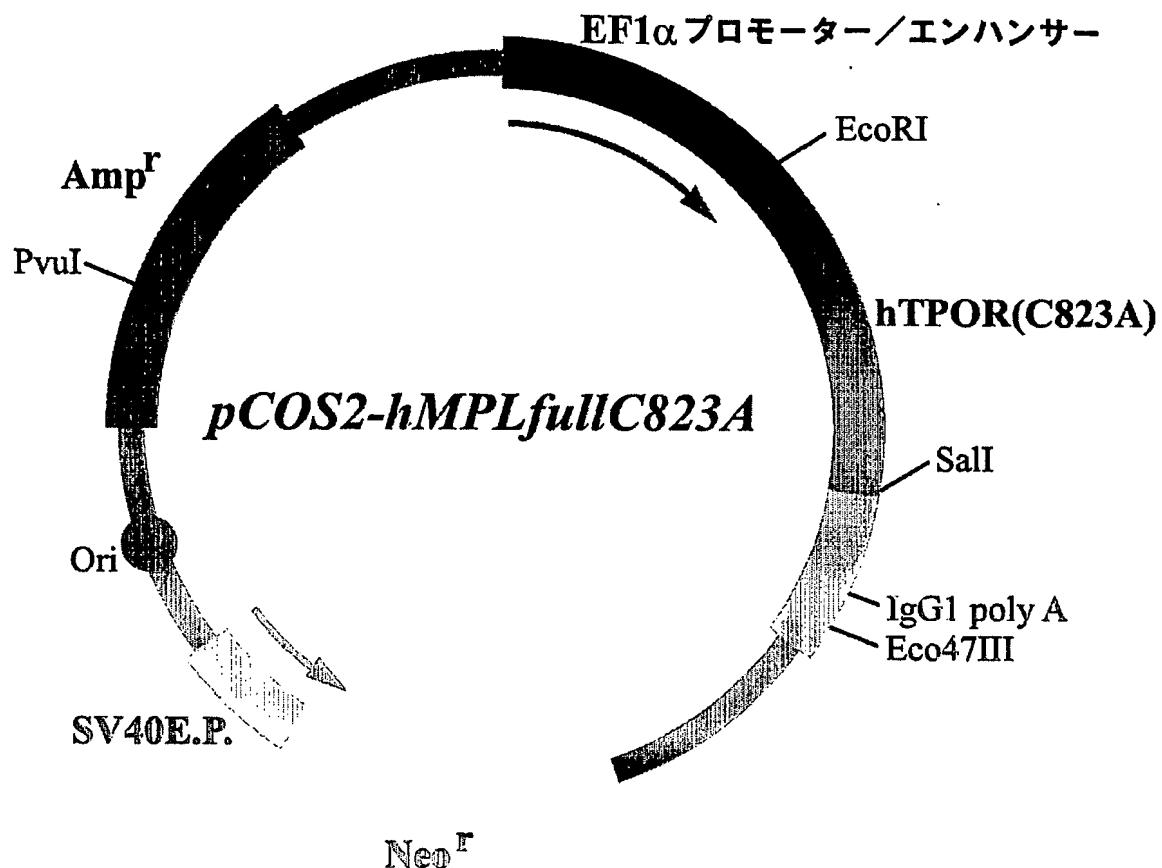
7 / 14

図 7



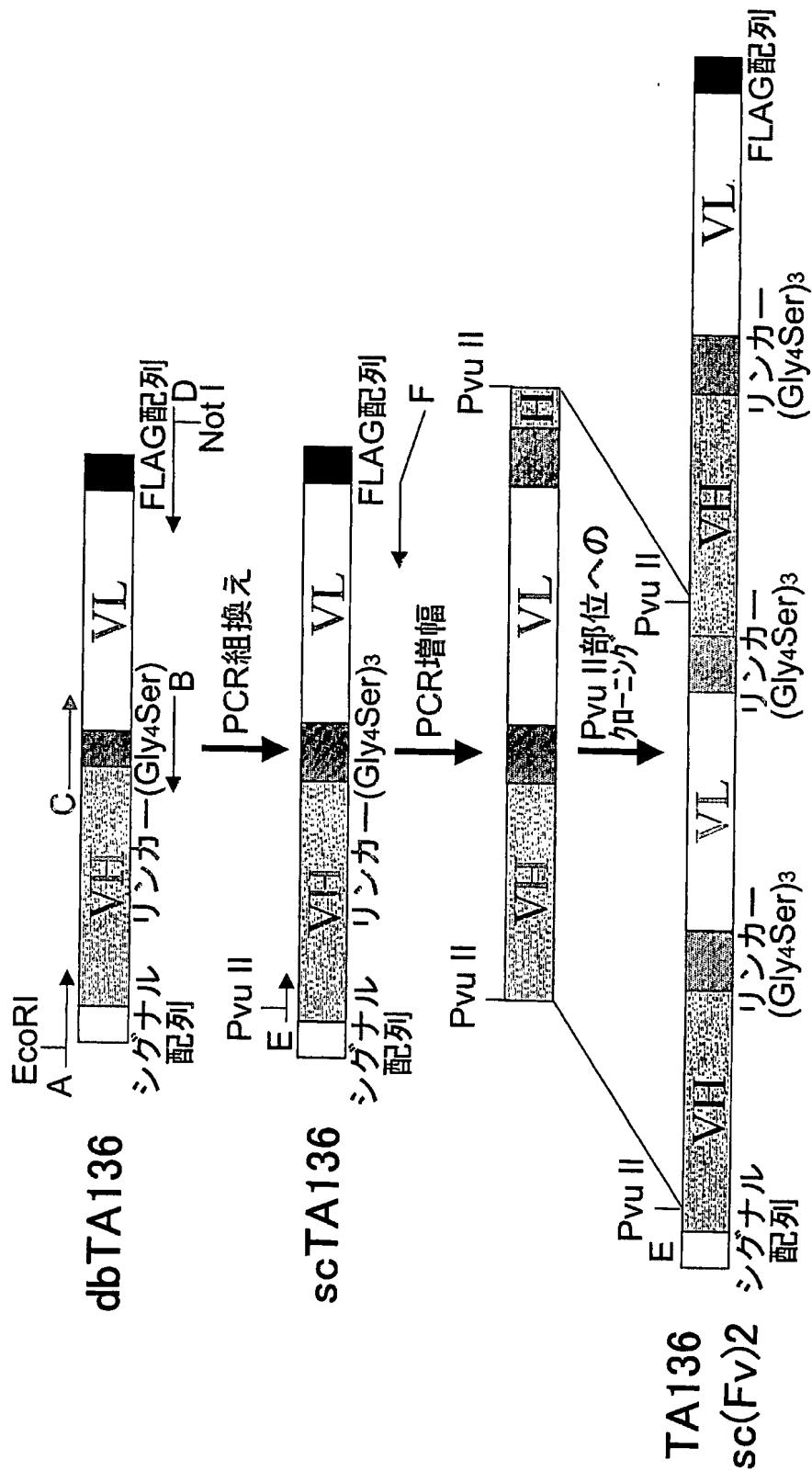
8 / 14

図 8



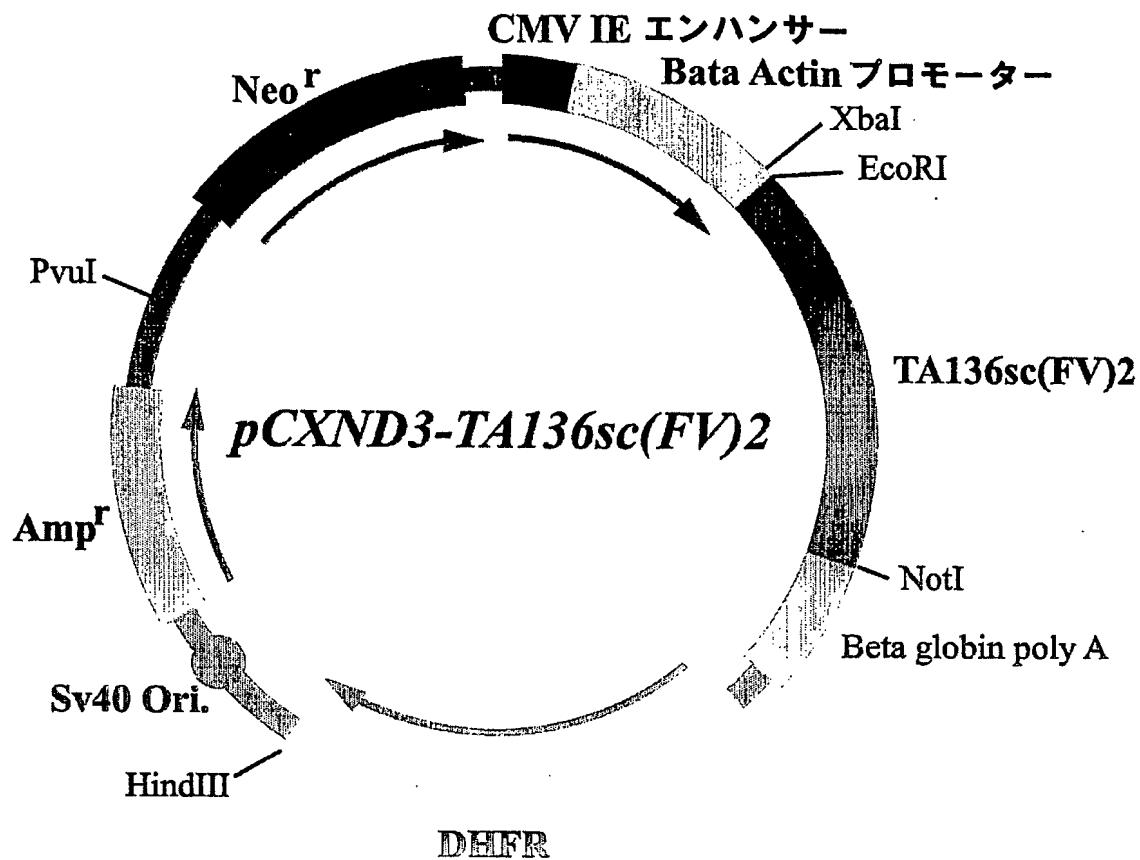
9 / 14

図 9



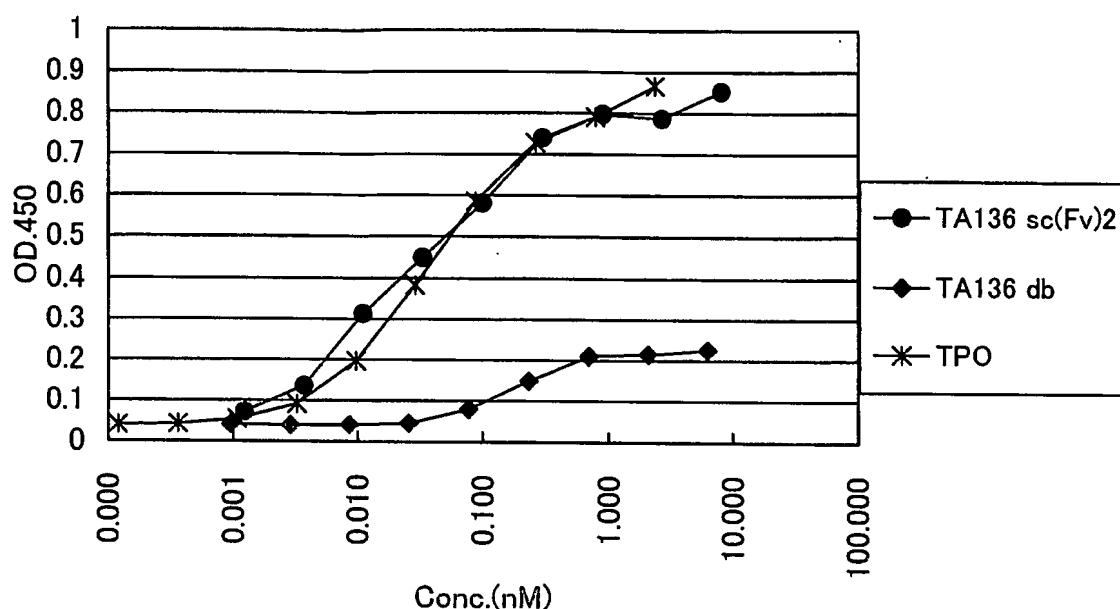
10 / 14

図 10



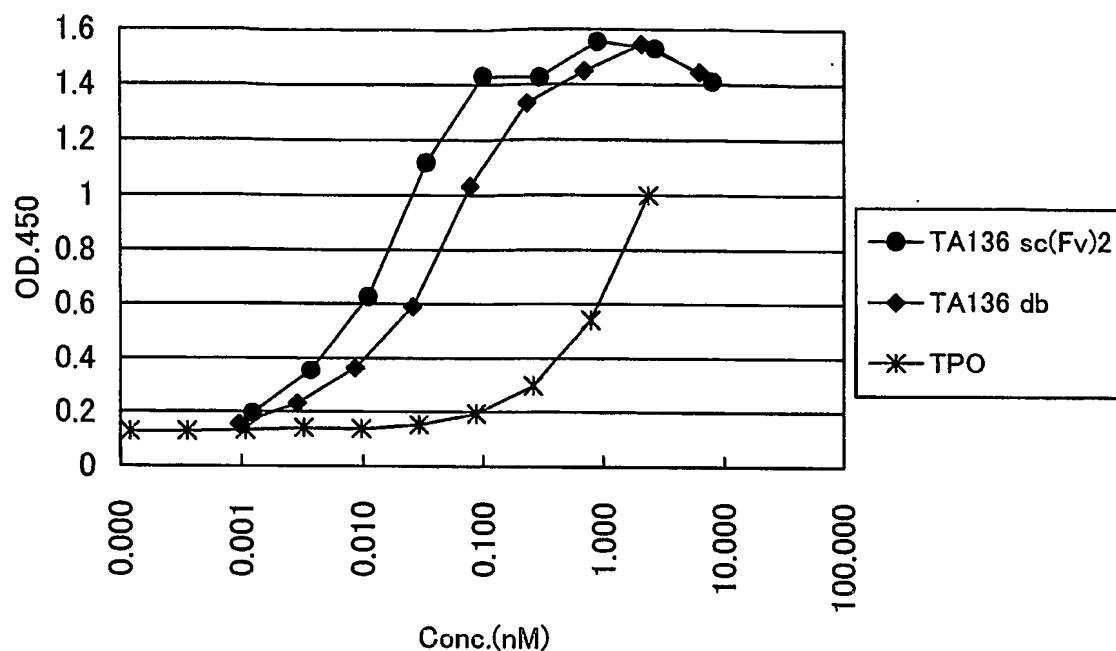
11 / 14

図 1 1



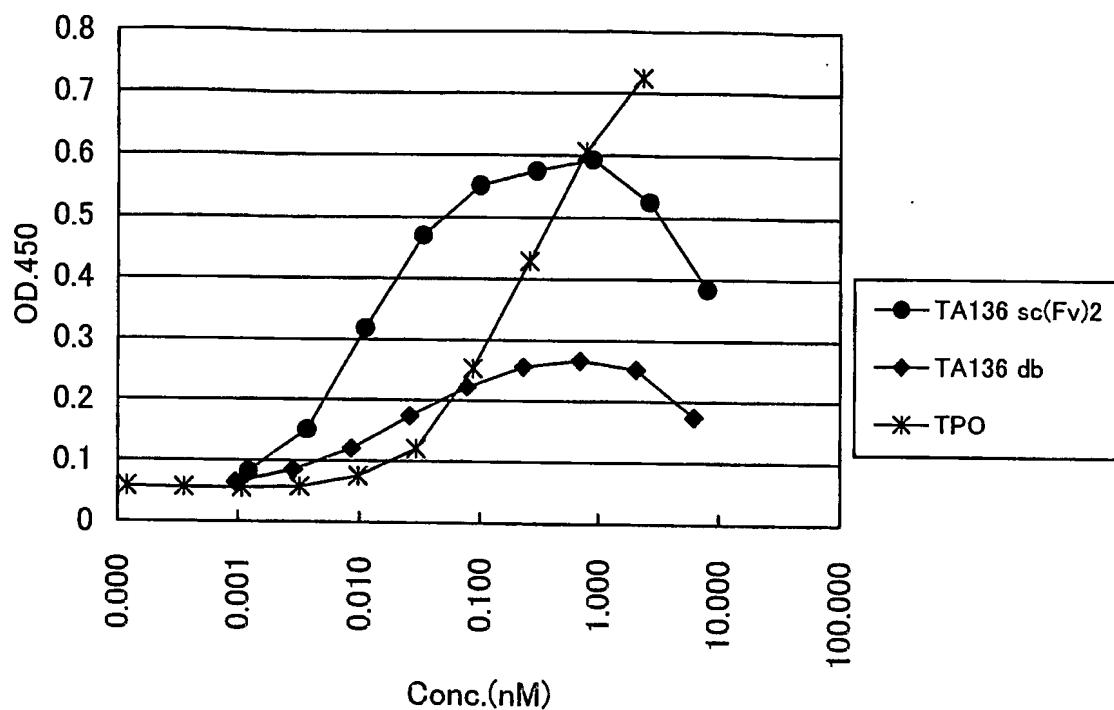
12 / 14

図 1 2



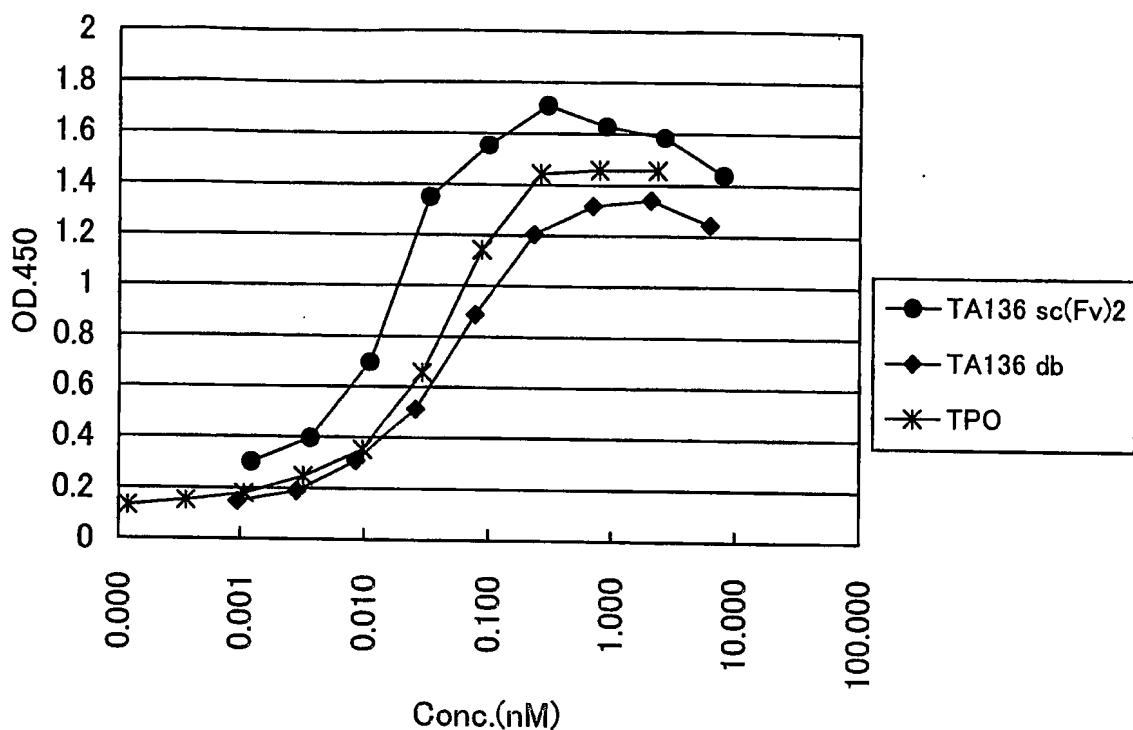
13 / 14

図 13



14 / 14

図 14



1 / 7 4

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Agonistic ligands against receptor variant

<130> C1-A0303P

<150> JP 2003-067832

<151> 2003-03-13

<160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1924

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (11)..(1918)

<223>

<400> 1

2 / 7 4

gaattccacc atg ccc tcc tgg gcc ctc ttc atg gtc acc tcc tgc ctc 49

Met Pro Ser Trp Ala Leu Phe Met Val Thr Ser Cys Leu

1 5 10

ctc ctg gcc cct caa aac ctg gcc caa gtc agc agc caa gat gtc tcc 97

Leu Leu Ala Pro Gln Asn Leu Ala Gln Val Ser Ser Gln Asp Val Ser

15 20 25

ttg ctg gca tca gac tca gag ccc ctg aag tgt ttc tcc cga aca ttt 145

Leu Leu Ala Ser Asp Ser Glu Pro Leu Lys Cys Phe Ser Arg Thr Phe

30 35 40 45

gag gac ctc act tgc ttc tgg gat gag gaa gag gca gcg ccc agt ggg 193

Glu Asp Leu Thr Cys Phe Trp Asp Glu Glu Ala Ala Pro Ser Gly

50 55 60

aca tac cag ctg ctg tat gcc tac ccg cgg gag aag ccc cgt gct tgc 241

Thr Tyr Gln Leu Leu Tyr Ala Tyr Pro Arg Glu Lys Pro Arg Ala Cys

65 70 75

ccc ctg agt tcc cag agc atg ccc cac ttt gga acc cga tac gtg tgc 289

Pro Leu Ser Ser Gln Ser Met Pro His Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys

80 85 90

cag ttt cca gac cag gag gaa gtg cgt ctc ttc ttt ccg ctg cac ctc 337

Gln Phe Pro Asp Gln Glu Glu Val Arg Leu Phe Phe Pro Leu His Leu

3 / 7 4

95 100 105

tgg gtg aag aat gtg ttc cta aac cag act cg^g act cag cga gtc ctc 385

Trp Val Lys Asn Val Phe Leu Asn Gln Thr Arg Thr Gln Arg Val Leu

110 115 120 125

ttt gtg gac agt gta ggc ctg ccg gct ccc ccc agt atc atc aag gcc 433

Phe Val Asp Ser Val Gly Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ile Ile Lys Ala

130 135 140

atg ggt ggg agc cag cca ggg gaa ctt cag atc agc tgg gag gag cca 481

Met Gly Gly Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gln Ile Ser Trp Glu Glu Pro

145 150 155

gct cca gaa atc agt gat ttc ctg agg tac gaa ctc cgc tat ggc ccc 529

Ala Pro Glu Ile Ser Asp Phe Leu Arg Tyr Glu Leu Arg Tyr Gly Pro

160 165 170

aga gat ccc aag aac tcc act ggt ccc acg gtc ata cag ctg att gcc 577

Arg Asp Pro Lys Asn Ser Thr Gly Pro Thr Val Ile Gln Leu Ile Ala

175 180 185

aca gaa acc tgc tgc cct gct ctg cag aga cct cac tca gcc tct gct 625

Thr Glu Thr Cys Cys Pro Ala Leu Gln Arg Pro His Ser Ala Ser Ala

190 195 200 205

4 / 7 4

ctg gac cag tct cca tgt gct cag ccc aca atg ccc tgg caa gat gga 673
Leu Asp Gln Ser Pro Cys Ala Gln Pro Thr Met Pro Trp Gln Asp Gly
 210 215 220

cca aag cag acc tcc cca agt aga gaa gct tca gct ctg aca gca gag 721
Pro Lys Gln Thr Ser Pro Ser Arg Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ala Glu
 225 230 235

ggt gga agc tgc ctc atc tca gga ctc cag cct ggc aac tcc tac tgg 769
Gly Gly Ser Cys Leu Ile Ser Gly Leu Gln Pro Gly Asn Ser Tyr Trp
 240 245 250

ctg cag ctg cgc agc gaa cct gat ggg atc tcc ctc ggt ggc tcc tgg 817
Leu Gln Leu Arg Ser Glu Pro Asp Gly Ile Ser Leu Gly Gly Ser Trp
 255 260 265

gga tcc tgg tcc ctc cct gtg act gtg gac ctg cct gga gat gca gtg 865
Gly Ser Trp Ser Leu Pro Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val
 270 275 280 285

gca ctt gga ctg caa tgc ttt acc ttg gac ctg aag aat gtt acc tgt 913
Ala Leu Gly Leu Gln Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Asn Val Thr Cys
 290 295 300

caa tgg cag caa cag gac cat gct agc tcc caa ggc ttc ttc tac cac 961
Gln Trp Gln Gln Gln Asp His Ala Ser Ser Gln Gly Phe Phe Tyr His

5 / 7 4

305 310 315

agc agg gca cgg tgc tgc ccc aga gac agg tac ccc atc tgg gag aac 1009
Ser Arg Ala Arg Cys Cys Pro Arg Asp Arg Tyr Pro Trp Glu Asn

320 325 330

tgc gaa gag gaa gag aaa aca aat cca gga cta cag acc cca cag ttc 1057
Cys Glu Glu Glu Glu Lys Thr Asn Pro Gly Leu Gln Thr Pro Gln Phe
335 340 345

tct cgc tgc cac ttc aag tca cga aat gac agc att att cac atc ctt 1105
Ser Arg Cys His Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Ile Ile His Ile Leu
350 355 360 365

gtg gag gtg acc aca gcc ccg ggt act gtt cac agc tac ctg ggc lcc 1153
Val Glu Val Thr Thr Ala Pro Gly Thr Val His Ser Tyr Leu Gly Ser
370 375 380

cct ttc tgg atc cac cag gct gtg cgc ctc ccc acc cca aac ttg cac 1201
Pro Phe Trp Ile His Gln Ala Val Arg Leu Pro Thr Pro Asn Leu His
385 390 395

tgg agg gag atc tcc agt ggg cat ctg gaa ttg gag tgg cag cac cca 1249
Trp Arg Glu Ile Ser Ser Gly His Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Pro
400 405 410

6 / 7 4

tcg tcc tgg gca gcc caa gag acc tgt tat caa ctc cga tac aca gga 1297
Ser Ser Trp Ala Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly
415 420 425

gaa ggc cat cag gac tgg aag gtg ctg gag ccg cct ctc ggg gcc cga 1345
Glu Gly His Gln Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Pro Leu Gly Ala Arg
430 435 440 445

gga ggg acc ctg gag ctg cgc ccg cga tct cgc tac cgt tta cag ctg 1393
Gly Gly Thr Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu
450 455 460

cgc gcc agg ctc aac ggc ccc acc tac caa ggt ccc tgg agc tcg tgg 1441
Arg Ala Arg Leu Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp
465 470 475

tcg gac cca act agg gtg gag acc gcc acc gag acc gcc tgg atc tcc 1489
Ser Asp Pro Thr Arg Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp Ile Ser
480 485 490

t tg gtg acc gct ctg cat cta gtg ctg ggc ctc agc gcc gtc ctg ggc 1537
Leu Val Thr Ala Leu His Leu Val Leu Gly Leu Ser Ala Val Leu Gly
495 500 505

ctg ctg ctg ctg agg tgg cag ttt cct gca cac tac agg aga ctg agg 1585
Leu Leu Leu Leu Arg Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg

7 / 7 4

510 515 520 525

cat gcc ctg tgg ccc tca ctt cca gac ctg cac cgg gtc cta ggc cag 1633
His Ala Leu Trp Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln

530 535 540

tac ctt agg gac act gca gcc ctg agc ccg ccc aag gcc aca gtc tca 1681
Tyr Leu Arg Asp Thr Ala Ala Leu Ser Pro Pro Lys Ala Thr Val Ser

545 550 555

gat acc tgt gaa gaa gtg gaa ccc agc ctc ctt gaa atc ctc ccc aag 1729
Asp Thr Cys Glu Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys

560 565 570

tcc tca gag agg act cct ttg ccc ctg tgt tcc tcc cag gcc cag atg 1777
Ser Ser Glu Arg Thr Pro Leu Pro Leu Cys Ser Ser Gln Ala Gln Met

575 580 585

gac tac cga aga ttg cag cct tct tgc ctg ggg acc atg ccc ctg tct 1825
Asp Tyr Arg Arg Leu Gln Pro Ser Cys Leu Gly Thr Met Pro Leu Ser

590 595 600 605

gtg tgc cca ccc atg gct gag tca ggg tcc tgc tgt acc acc cac att 1873
Val Cys Pro Pro Met Ala Glu Ser Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile

610 615 620

9 / 74

65 70 75 80

Ser Gln Ser Met Pro His Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys Gln Phe Pro

85 90 95

Asp Gln Glu Glu Val Arg Leu Phe Phe Pro Leu His Leu Trp Val Lys

100 105 110

Asn Val Phe Leu Asn Gln Thr Arg Thr Gln Arg Val Leu Phe Val Asp

115 120 125

Ser Val Gly Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ile Ile Lys Ala Met Gly Gly

130 135 140

Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gln Ile Ser Trp Glu Glu Pro Ala Pro Glu

145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Leu Arg Tyr Glu Leu Arg Tyr Gly Pro Arg Asp Pro

165 170 175

Lys Asn Ser Thr Gly Pro Thr Val Ile Gln Leu Ile Ala Thr Glu Thr

180 185 190

Cys Cys Pro Ala Leu Gln Arg Pro His Ser Ala Ser Ala Leu Asp Gln

195 200 205

10 / 74

Ser Pro Cys Ala Gln Pro Thr Met Pro Trp Gln Asp Gly Pro Lys Gln

210

215

220

Thr Ser Pro Ser Arg Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ala Glu Gly Gly Ser

225

230

235

240

Cys Leu Ile Ser Gly Leu Gln Pro Gly Asn Ser Tyr Trp Leu Gln Leu

245

250

255

Arg Ser Glu Pro Asp Gly Ile Ser Leu Gly Gly Ser Trp Gly Ser Trp

260

265

270

Ser Leu Pro Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val Ala Leu Gly

275

280

285

Leu Gln Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Asn Val Thr Cys Gln Trp Gln

290

295

300

Gln Gln Asp His Ala Ser Ser Gln Gly Phe Phe Tyr His Ser Arg Ala

305

310

315

320

Arg Cys Cys Pro Arg Asp Arg Tyr Pro Ile Trp Glu Asn Cys Glu Glu

325

330

335

Glu Glu Lys Thr Asn Pro Gly Leu Gln Thr Pro Gln Phe Ser Arg Cys

340

345

350

1 1 / 7 4

His Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Ile Ile His Ile Leu Val Glu Val

355 360 365

Thr Thr Ala Pro Gly Thr Val His Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Phe Trp

370 375 380

Ile His Gln Ala Val Arg Leu Pro Thr Pro Asn Leu His Trp Arg Glu

385 390 395 400

Ile Ser Ser Gly His Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Pro Ser Ser Trp

405 410 415

Ala Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly Glu Gly His

420 425 430

Gln Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Pro Leu Gly Ala Arg Gly Gly Thr

435 440 445

Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu Arg Ala Arg

450 455 460

Leu Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp Ser Asp Pro

465 470 475 480

Thr Arg Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp Ile Ser Leu Val Thr

1 2 / 7 4

485 490 495

Ala Leu His Leu Val Leu Gly Leu Ser Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu

500 505 510

Leu Arg Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg His Ala Leu

515 520 525

Trp Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln Tyr Leu Arg

530 535 540

Asp Thr Ala Ala Leu Ser Pro Pro Lys Ala Thr Val Ser Asp Thr Cys

545 550 555 560

Glu Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys Ser Ser Glu

565 570 575

Arg Thr Pro Leu Pro Leu Cys Ser Ser Gln Ala Gln Met Asp Tyr Arg

580 585 590

' Arg Leu Gln Pro Ser Cys Leu Gly Thr Met Pro Leu Ser Val Cys Pro

595 600 605

Pro Met Ala Glu Ser Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile Ala Asn His

610 615 620

1 3 / 7 4

Ser Tyr Leu Pro Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro

625 630 635

<210> 3

<211> 1924

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (11)..(1918)

<223>

<400> 3

gaattccacc atg ccc tcc tgg gcc ctc ttc atg gtc acc tcc tgc ctc 49

Met Pro Ser Trp Ala Leu Phe Met Val Thr Ser Cys Leu

1 5 10

ctc ctg gcc cct caa aac ctg gcc caa gtc agc agc caa gat gtc tcc 97

Leu Leu Ala Pro Gln Asn Leu Ala Gln Val Ser Ser Gln Asp Val Ser

15 20 25

ttg ctg gca tca gac tca gag ccc ctg aag tgt ttc tcc cga aca ttt 145

Leu Leu Ala Ser Asp Ser Glu Pro Leu Lys Cys Phe Ser Arg Thr Phe

30 35 40 45

1 4 / 7 4

gag gac ctc act tgc ttc tgg gat gag gaa gag gca gcg ccc agt ggg 193
Glu Asp Leu Thr Cys Phe Trp Asp Glu Glu Ala Ala Pro Ser Gly

50 55 60

aca tac cag ctg ctg tat gcc tac ccg cgg gag aag ccc cgt gct tgc 241
Thr Tyr Gln Leu Leu Tyr Ala Tyr Pro Arg Glu Lys Pro Arg Ala Cys
65 70 75

ccc ctg agt tcc cag agc atg ccc cac ttt gga acc cga tac gtg tgc 289
Pro Leu Ser Ser Gln Ser Met Pro His Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys
80 85 90

cag ttt cca gac cag gag gaa gtg cct ctc ttc ttt ccg ctg cac ctc 337
Gln Phe Pro Asp Gln Glu Glu Val Pro Leu Phe Phe Pro Leu His Leu
95 100 105

tgg gtg aag aat gtg ttc cta aac cag act cgg act cag cga gtc ctc 385
Trp Val Lys Asn Val Phe Leu Asn Gln Thr Arg Thr Gln Arg Val Leu
110 115 120 125

ttt gtg gac agt gta ggc ctg ccg gct ccc ccc agt atc atc aag gcc 433
Phe Val Asp Ser Val Gly Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ile Ile Lys Ala
130 135 140

atg ggt ggg agc cag cca ggg gaa ctt cag atc agc tgg gag gag cca 481

15 / 74

Met Gly Gly Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gln Ile Ser Trp Glu Glu Pro

145 150 155

gct cca gaa atc agt gat ttc ctg agg tac gaa ctc cgc tat ggc ccc 529

Ala Pro Glu Ile Ser Asp Phe Leu Arg Tyr Glu Leu Arg Tyr Gly Pro

160 165 170

aga gat ccc aag aac tcc act ggt ccc acg gtc ata cag ctg att gcc 577

Arg Asp Pro Lys Asn Ser Thr Gly Pro Thr Val Ile Gln Leu Ile Ala

175 180 185

aca gaa acc tgc tgc cct gct ctg cag aga cct cac tca gcc tct gct 625

Thr Glu Thr Cys Cys Pro Ala Leu Gln Arg Pro His Ser Ala Ser Ala

190 195 200 205

ctg gac cag tct cca tgt gct cag ccc aca atg ccc tgg caa gat gga 673

Leu Asp Gln Ser Pro Cys Ala Gln Pro Thr Met Pro Trp Gln Asp Gly

210 215 220

cca aag cag acc tcc cca agt aga gaa gct tca gct ctg aca gca gag 721

Pro Lys Gln Thr Ser Pro Ser Arg Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ala Glu

225 230 235

ggg gga agc tgc ctc atc tca gga ctc cag cct ggc aac tcc tac tgg 769

Gly Gly Ser Cys Leu Ile Ser Gly Leu Gln Pro Gly Asn Ser Tyr Trp

240 245 250

1 6 / 7 4

ctg cag ctg cgc agc gaa cct gat ggg atc tcc ctc ggt ggc tcc tgg 817

Leu Gln Leu Arg Ser Glu Pro Asp Gly Ile Ser Leu Gly Gly Ser Trp

255

260

265

gga tcc tgg tcc ctc cct gtg act gtg gac ctg cct gga gat gca gtg 865

Gly Ser Trp Ser Leu Pro Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val

270

275

280

285

gca ctt gga ctg caa tgc ttt acc ttg gac ctg aag aat gtt acc tgt 913

Ala Leu Gly Leu Gln Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Asn Val Thr Cys

290

295

300

caa tgg cag caa cag gac cat gct agc tcc caa ggc ttc ttc tac cac 961

Gln Trp Gln Gln Gln Asp His Ala Ser Ser Gln Gly Phe Phe Tyr His

305

310

315

agc agg gca cgg tgc tgc ccc aga gac agg tac ccc atc tgg gag aac 1009

Ser Arg Ala Arg Cys Cys Pro Arg Asp Arg Tyr Pro Ile Trp Glu Asn

320

325

330

tgc gaa gag gaa gag aaa aca aat cca gga cta cag acc cca cag ttc 1057

Cys Glu Glu Glu Lys Thr Asn Pro Gly Leu Gln Thr Pro Gln Phe

335

340

345

tct cgc tgc cac ttc aag tca cga aat gac agc att att cac atc ctt 1105

1 7 / 7 4

Ser Arg Cys His Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Ile Ile His Ile Leu

350 355 360 365

gtg gag gtg acc aca gcc ccg ggt act gtt cac agc tac ctg ggc tcc 1153

Val Glu Val Thr Thr Ala Pro Gly Thr Val His Ser Tyr Leu Gly Ser

370 375 380

cct ttc tgg atc cac cag gct gtg cgc ctc ccc acc cca aac ttg cac 1201

Pro Phe Trp Ile His Gln Ala Val Arg Leu Pro Thr Pro Asn Leu His

385 390 395

tgg agg gag atc tcc agt ggg cat ctg gaa ttg gag tgg cag cac cca 1249

Trp Arg Glu Ile Ser Ser Gly His Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Pro

400 405 410

tcg tcc tgg gca gcc caa gag acc tgt tat caa ctc cga tac aca gga 1297

Ser Ser Trp Ala Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly

415 420 425

gaa ggc cat cag gac tgg aag gtg ctg gag ccg cct ctc ggg gcc cga 1345

Glu Gly His Gln Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Pro Leu Gly Ala Arg

430 435 440 445

gga ggg acc ctg gag ctg cgc ccg cga tct cgc tac cgt tta cag ctg 1393

Gly Gly Thr Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu

450 455 460

1 8 / 7 4

cgc gcc agg ctc aac ggc ccc acc tac caa ggt ccc tgg agc tcg tgg 1441
Arg Ala Arg Leu Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp

465 470 475

tcg gac cca act agg gtg gag acc gcc acc gag acc gcc tgg atc tcc 1489
Ser Asp Pro Thr Arg Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp Ile Ser
480 485 490

ttg gtg acc gct ctg cat cta gtg ctg ggc ctc agc gcc gtc ctg ggc 1537
Leu Val Thr Ala Leu His Leu Val Leu Gly Leu Ser Ala Val Leu Gly
495 500 505

ctg ctg ctg ctg agg tgg cag ttt cct gca cac tac agg aga ctg agg 1585
Leu Leu Leu Leu Arg Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg
510 515 520 525

cat gcc ctg tgg ccc tca ctt cca gac ctg cac cgg gtc cta ggc cag 1633
His Ala Leu Trp Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln
530 535 540

tac ctt agg gac act gca gcc ctg agc ccg ccc aag gcc aca gtc tca 1681
Tyr Leu Arg Asp Thr Ala Ala Leu Ser Pro Pro Lys Ala Thr Val Ser
545 550 555

gat acc tgt gaa gaa gtg gaa ccc agc ctc ctt gaa atc ctc ccc aag 1729

1 9 / 7 4

Asp Thr Cys Glu Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys

560 565 570

tcc tca gag agg act cct ttg ccc ctg tgt tcc tcc cag gcc cag atg 1777

Ser Ser Glu Arg Thr Pro Leu Pro Leu Cys Ser Ser Gln Ala Gln Met

575 580 585

gac tac cga aga ttg cag cct tct tgc ctg ggg acc atg ccc ctg tct 1825

Asp Tyr Arg Arg Leu Gln Pro Ser Cys Leu Gly Thr Met Pro Leu Ser

590 595 600 605

gtg tgc cca ccc atg gct gag tca ggg tcc tgc tgt acc acc cac att 1873

Val Cys Pro Pro Met Ala Glu Ser Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile

610 615 620

gcc aac cat tcc tac cta cca cta agc tat tgg cag cag cct tga 1918

Ala Asn His Ser Tyr Leu Pro Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro

625 630 635

gtcgac 1924

<210> 4

<211> 635

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 / 74

<400> 4

Met Pro Ser Trp Ala Leu Phe Met Val Thr Ser Cys Leu Leu Ala
1 5 10 15

Pro Gln Asn Leu Ala Gln Val Ser Ser Gln Asp Val Ser Leu Leu Ala
20 25 30

Ser Asp Ser Glu Pro Leu Lys Cys Phe Ser Arg Thr Phe Glu Asp Leu
35 40 45

Thr Cys Phe Trp Asp Glu Glu Glu Ala Ala Pro Ser Gly Thr Tyr Gln
50 55 60

Leu Leu Tyr Ala Tyr Pro Arg Glu Lys Pro Arg Ala Cys Pro Leu Ser
65 70 75 80

Ser Gln Ser Met Pro His Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys Gln Phe Pro
85 90 95

Asp Gln Glu Glu Val Pro Leu Phe Phe Pro Leu His Leu Trp Val Lys
100 105 110

Asn Val Phe Leu Asn Gln Thr Arg Thr Gln Arg Val Leu Phe Val Asp
115 120 125

21 / 74

Ser Val Gly Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ile Ile Lys Ala Met Gly Gly

130 135 140

Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gln Ile Ser Trp Glu Glu Pro Ala Pro Glu

145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Leu Arg Tyr Glu Leu Arg Tyr Gly Pro Arg Asp Pro

165 170 175

Lys Asn Ser Thr Gly Pro Thr Val Ile Gln Leu Ile Ala Thr Glu Thr

180 185 190

Cys Cys Pro Ala Leu Gln Arg Pro His Ser Ala Ser Ala Leu Asp Gln

195 200 205

Ser Pro Cys Ala Gln Pro Thr Met Pro Trp Gln Asp Gly Pro Lys Gln

210 215 220

Thr Ser Pro Ser Arg Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ala Glu Gly Gly Ser

225 230 235 240

Cys Leu Ile Ser Gly Leu Gln Pro Gly Asn Ser Tyr Trp Leu Gln Leu

245 250 255

Arg Ser Glu Pro Asp Gly Ile Ser Leu Gly Gly Ser Trp Gly Ser Trp

260 265 270

22 / 74

Ser Leu Pro Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val Ala Leu Gly

275 280 285

Leu Gln Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Asn Val Thr Cys Gln Trp Gln

290 295 300

Gln Gln Asp His Ala Ser Ser Gln Gly Phe Phe Tyr His Ser Arg Ala

305 310 315 320

Arg Cys Cys Pro Arg Asp Arg Tyr Pro Ile Trp Glu Asn Cys Glu Glu

325 330 335

Glu Glu Lys Thr Asn Pro Gly Leu Gln Thr Pro Gln Phe Ser Arg Cys

340 345 350

His Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Ile Ile His Ile Leu Val Glu Val

355 360 365

Thr Thr Ala Pro Gly Thr Val His Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Phe Trp

370 375 380

Ile His Gln Ala Val Arg Leu Pro Thr Pro Asn Leu His Trp Arg Glu

385 390 395 400

Ile Ser Ser Gly His Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Pro Ser Ser Trp

23 / 74

405

410

415

Ala Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly Glu Gly His

420

425

430

Gln Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Pro Leu Gly Ala Arg Gly Gly Thr

435

440

445

Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu Arg Ala Arg

450

455

460

Leu Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp Ser Asp Pro

465

470

475

480

Thr Arg Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp Ile Ser Leu Val Thr

485

490

495

Ala Leu His Leu Val Leu Gly Leu Ser Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu

500

505

510

Leu Arg Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg His Ala Leu

515

520

525

Trp Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln Tyr Leu Arg

530

535

540

2 4 / 7 4

Asp Thr Ala Ala Leu Ser Pro Pro Lys Ala Thr Val Ser Asp Thr Cys

545

550

555

560

Glu Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys Ser Ser Glu

565

570

575

Arg Thr Pro Leu Pro Leu Cys Ser Ser Gln Ala Gln Met Asp Tyr Arg

580

585

590

Arg Leu Gln Pro Ser Cys Leu Gly Thr Met Pro Leu Ser Val Cys Pro

595

600

605

Pro Met Ala Glu Ser Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile Ala Asn His

610

615

620

Ser Tyr Leu Pro Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro

625

630

635

<210> 5

<211> 1506

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

25 / 74

<222> (1).. (1506)

<223>

<400> 5

atg gta agc gct att gtt tta tat gtg ctt ttg gcg gcg gcg cat 48
Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala His
1 5 10 15

tct gcc ttt gcg gat ctg cat caa gat gtc tcc ttg ctg gca tca gac 96
Ser Ala Phe Ala Asp Leu His Gln Asp Val Ser Leu Leu Ala Ser Asp
20 25 30

tca gag ccc ctg aag tgt ttc tcc cga aca ttt gag gac ctc act tgc 144
Ser Glu Pro Leu Lys Cys Phe Ser Arg Thr Phe Glu Asp Leu Thr Cys
35 40 45

ttc tgg gat gag gaa gag gca gcg ccc agt ggg aca tac cag ctg ctg 192
Phe Trp Asp Glu Glu Ala Ala Pro Ser Gly Thr Tyr Gln Leu Leu
50 55 60

tat gcc tac ccg cgg gag aag ccc cgt gct tgc ccc ctg agt tcc cag 240
Tyr Ala Tyr Pro Arg Glu Lys Pro Arg Ala Cys Pro Leu Ser Ser Gln
65 70 75 80

agc atg ccc cac ttt gga acc cga tac gtg tgc cag ttt cca gac cag 288
Ser Met Pro His Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys Gln Phe Pro Asp Gln

2 6 / 7 4

85 90 95

gag gaa gtg cgt ctc ttc ccg ctg cac ctc tgg gtg aag aat gtg 336
Glu Glu Val Arg Leu Phe Phe Pro Leu His Leu Trp Val Lys Asn Val

100 105 110

ttc cta aac cag act cgg act cag cga gtc ctc ttt gtg gac agt gta 384
Phe Leu Asn Gln Thr Arg Thr Gln Arg Val Leu Phe Val Asp Ser Val

115 120 125

ggc ctg ccg gct ccc ccc agt atc atc aag gcc atg ggt ggg agc cag 432
Gly Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ile Ile Lys Ala Met Gly Gly Ser Gln

130 135 140

cca ggg gaa ctt cag atc agc tgg gag gag cca gct cca gaa atc agt 480
Pro Gly Glu Leu Gln Ile Ser Trp Glu Glu Pro Ala Pro Glu Ile Ser
145 150 155 160

gat ttc ctg agg tac gaa ctc cgc tat ggc ccc aga gat ccc aag aac 528
Asp Phe Leu Arg Tyr Glu Leu Arg Tyr Gly Pro Arg Asp Pro Lys Asn
165 170 175

tcc act ggt ccc acg gtc ata cag ctg att gcc aca gaa acc tgc tgc 576
Ser Thr Gly Pro Thr Val Ile Gln Leu Ile Ala Thr Glu Thr Cys Cys
180 185 190

27 / 74

cct gct ctg cag aga cct cac tca gcc tct gct ctg gac cag tct cca 624

Pro Ala Leu Gln Arg Pro His Ser Ala Ser Ala Leu Asp Gln Ser Pro

195

200

205

tgt gct cag ccc aca atg ccc tgg caa gat gga cca aag cag acc tcc 672

Cys Ala Gln Pro Thr Met Pro Trp Gln Asp Gly Pro Lys Gln Thr Ser

210

215

220

cca agt aga gaa gct tca gct ctg aca gca gag ggt gga agc tgc ctc 720

Pro Ser Arg Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ala Glu Gly Gly Ser Cys Leu

225

230

235

240

atc tca gga ctc cag cct ggc aac tcc tac tgg ctg cag ctg cgc agc 768

Ile Ser Gly Leu Gln Pro Gly Asn Ser Tyr Trp Leu Gln Leu Arg Ser

245

250

255

gaa cct gat ggg atc tcc ctc ggt ggc tcc tgg gga tcc tgg tcc ctc 816

Glu Pro Asp Gly Ile Ser Leu Gly Gly Ser Trp Gly Ser Trp Ser Leu

260

265

270

cct gtg act gtg gac ctg cct gga gat gca gtg gca ctt gga ctg caa 864

Pro Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val Ala Leu Gly Leu Gln

275

280

285

tgc ttt acc ttg gac ctg aag aat gtt acc tgt caa tgg cag caa cag 912

Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Asn Val Thr Cys Gln Trp Gln Gln

2 8 / 7 4

290 295 300

gac cat gct agc tcc caa ggc ttc ttc tac cac agc agg gca cgg tgc 960

Asp His Ala Ser Ser Gln Gly Phe Phe Tyr His Ser Arg Ala Arg Cys

305 310 315 320

tgc ccc aga gac agg tac ccc atc tgg gag aac tgc gaa gag gaa gag 1008

Cys Pro Arg Asp Arg Tyr Pro Ile Trp Glu Asn Cys Glu Glu Glu

325 330 335

aaa aca aat cca gga cta cag acc cca cag ttc tct cgc tgc cac ttc 1056

Lys Thr Asn Pro Gly Leu Gln Thr Pro Gln Phe Ser Arg Cys His Phe

340 345 350

aag tca cga aat gac agc att att cac atc ctt gtg gag gtg acc aca 1104

Lys Ser Arg Asn Asp Ser Ile Ile His Ile Leu Val Glu Val Thr Thr

355 360 365

gcc ccg ggt act gtt cac agc tac ctg ggc tcc cct ttc tgg atc cac 1152

Ala Pro Gly Thr Val His Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Phe Trp Ile His

370 375 380

cag gct gtg cgc ctc ccc acc cca aac ttg cac tgg agg gag atc tcc 1200

Gln Ala Val Arg Leu Pro Thr Pro Asn Leu His Trp Arg Glu Ile Ser

385 390 395 400

29 / 74

agt ggg cat ctg gaa ttg gag tgg cag cac cca tcg tcc tgg gca gcc 1248

Ser Gly His Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Pro Ser Ser Trp Ala Ala

405

410

415

caa gag acc tgt tat caa ctc cga tac aca gga gaa ggc cat cag gac 1296

Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly Glu Gly His Gln Asp

420

425

430

tgg aag gtg ctg gag ccg cct ctc ggg gcc cga gga ggg acc ctg gag 1344

Trp Lys Val Leu Glu Pro Pro Leu Gly Ala Arg Gly Gly Thr Leu Glu

435

440

445

ctg cgc ccg cga tct cgc tac cgt tta cag ctg cgc gcc agg ctc aac 1392

Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Asn

450

455

460

ggc ccc acc tac caa ggt ccc tgg agc tcg tgg tcg gac cca act agg 1440

Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp Ser Asp Pro Thr Arg

465

470

475

480

gtg gag acc gcc acc gag acc gcc tgg gtc gac gga tcc gac tac aag 1488

Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp Val Asp Gly Ser Asp Tyr Lys

485

490

495

gac gac gat gac aag tga

1506

Asp Asp Asp Asp Lys

30 / 74

500

<210> 6

<211> 501

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala His

1 5 10 15

Ser Ala Phe Ala Asp Leu His Gln Asp Val Ser Leu Leu Ala Ser Asp

20 25 30

Ser Glu Pro Leu Lys Cys Phe Ser Arg Thr Phe Glu Asp Leu Thr Cys

35 40 45

Phe Trp Asp Glu Glu Glu Ala Ala Pro Ser Gly Thr Tyr Gln Leu Leu

50 55 60

Tyr Ala Tyr Pro Arg Glu Lys Pro Arg Ala Cys Pro Leu Ser Ser Gln

65 70 75 80

Ser Met Pro His Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys Gln Phe Pro Asp Gln

85 90 95

3 1 / 7 4

Glu Glu Val Arg Leu Phe Phe Pro Leu His Leu Trp Val Lys Asn Val

100 105 110

Phe Leu Asn Gln Thr Arg Thr Gln Arg Val Leu Phe Val Asp Ser Val

115 120 125

Gly Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ile Ile Lys Ala Met Gly Gly Ser Gln

130 135 140

Pro Gly Glu Leu Gln Ile Ser Trp Glu Glu Pro Ala Pro Glu Ile Ser

145 150 155 160

Asp Phe Leu Arg Tyr Glu Leu Arg Tyr Gly Pro Arg Asp Pro Lys Asn

165 170 175

Ser Thr Gly Pro Thr Val Ile Gln Leu Ile Ala Thr Glu Thr Cys Cys

180 185 190

Pro Ala Leu Gln Arg Pro His Ser Ala Ser Ala Leu Asp Gln Ser Pro

195 200 205

Cys Ala Gln Pro Thr Met Pro Trp Gln Asp Gly Pro Lys Gln Thr Ser

210 215 220

Pro Ser Arg Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ala Glu Gly Gly Ser Cys Leu

3 2 / 7 4

225 230 235 240

Ile Ser Gly Leu Gln Pro Gly Asn Ser Tyr Trp Leu Gln Leu Arg Ser

245 250 255

Glu Pro Asp Gly Ile Ser Leu Gly Gly Ser Trp Gly Ser Trp Ser Leu

260 265 270

Pro Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val Ala Leu Gly Leu Gln

275 280 285

Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Asn Val Thr Cys Gln Trp Gln Gln Gln

290 295 300

Asp His Ala Ser Ser Gln Gly Phe Phe Tyr His Ser Arg Ala Arg Cys

305 310 315 320

Cys Pro Arg Asp Arg Tyr Pro Ile Trp Glu Asn Cys Glu Glu Glu

325 330 335

Lys Thr Asn Pro Gly Leu Gln Thr Pro Gln Phe Ser Arg Cys His Phe

340 345 350

Lys Ser Arg Asn Asp Ser Ile Ile His Ile Leu Val Glu Val Thr Thr

355 360 365

33 / 74

Ala Pro Gly Thr Val His Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Phe Trp Ile His

370 375 380

Gln Ala Val Arg Leu Pro Thr Pro Asn Leu His Trp Arg Glu Ile Ser

385 390 395 400

Ser Gly His Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Pro Ser Ser Trp Ala Ala

405 410 415

Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly Glu Gly His Gln Asp

420 425 430

Trp Lys Val Leu Glu Pro Pro Leu Gly Ala Arg Gly Gly Thr Leu Glu

435 440 445

Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu Arg Ala Arg Leu Asn

450 455 460

Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp Ser Asp Pro Thr Arg

465 470 475 480

Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp Val Asp Gly Ser Asp Tyr Lys

485 490 495

Asp Asp Asp Asp Lys

500

3 4 / 7 4

<210> 7

<211> 768

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(768)

<223>

<400> 7

atg	aga	gtg	ctg	att	cct	tgt	tgg	ctg	ttc	aca	gcc	ttt	cct	ggt	acc	48
Met	Arg	Val	Leu	Ile	Pro	Leu	Trp	Leu	Phe	Thr	Ala	Phe	Pro	Gly	Thr	
1					5					10					15	

ctg	tct	gat	gtg	cag	ctg	cag	gag	tgc	gga	cct	ggc	ctg	gtg	aaa	cct	96
Leu	Ser	Asp	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	
					20					25					30	

tct	cag	tct	ctg	tcc	ctc	acc	tgc	act	gtc	act	ggc	tac	tca	atc	acc	144
Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	
										35		40			45	

agt	gat	tat	gcc	tgg	agc	tgg	atc	cga	cag	tta	cca	gga	aac	aaa	ctg	192
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

35 / 74

Ser Asp Tyr Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Asn Lys Leu

50	55	60
----	----	----

gag tgg atg ggc tac ata acg tac agt ggt tac tct atc tac aat cca 240

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Tyr Ser Ile Tyr Asn Pro

65	70	75	80
----	----	----	----

tct ctc aaa agt cga atc tct atc agt cga gac aca tcc aag aac cag 288

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln

85	90	95
----	----	----

ttg ttc ctg cag tta aat tct gtg acc act gag gac aca gcc aca tat 336

Leu Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr

100	105	110
-----	-----	-----

tac tgt gtg ggc ggg tat gac aat atg gac tat tgg ggt caa gga acc 384

Tyr Cys Val Gly Gly Tyr Asp Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115	120	125
-----	-----	-----

tca gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggc gga tcg caa att gtt ctc acc 432

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr

130	135	140
-----	-----	-----

cag tct cca gca atc atg tct gca tct cct ggg gag aag gtc acc ttg 480

Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Leu

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

36 / 74

acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt tcc agc cac tta tac tgg tat 528
Thr Cys Ser Ala Ser Ser Val Ser Ser His Leu Tyr Trp Tyr

165 170 175

cag cag aag cca ggg tcc tcc ccc aaa ctc tgg att tat agc aca tcc 576
 Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser
 180 185 190

180 185 190

aac ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg 624
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly

195 200 205

acc tcc tat tct ctc aca atc agc aac atg gag act gaa gat gct gcc 672
 Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Met Glu Thr Glu Asp Ala Ala
 210 215 220

210 215 220

tct tat ttc tgc cat cag tgg agt agt tac cca tgg acg ttc ggt ggg 720
 Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly
 225 230 235 240

ggc acc aag ctg gaa atc aaa gac tac aag gat gac gac gat aag tga 768
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 245 250 255

37 / 74

<210> 8

<211> 255

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Arg Val Leu Ile Pro Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Thr
1 5 10 15

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
20 25 30

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
35 40 45

Ser Asp Tyr Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Asn Lys Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Tyr Ser Ile Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Leu Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110

3 8 / 7 4

Tyr Cys Val Gly Gly Tyr Asp Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr

130 135 140

Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Leu

145 150 155 160

Thr Cys Ser Ala Ser Ser Val Ser Ser Ser His Leu Tyr Trp Tyr

165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser

180 185 190

Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly

195 200 205

Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Met Glu Thr Glu Asp Ala Ala

210 215 220

Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly

225 230 235 240

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

3 9 / 7 4

245

250

255

<210> 9

<211> 1924

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (11)..(1918)

<223>

<400> 9

gaattccacc atg ccc tcc tgg gcc ctc ttc atg gtc acc tcc tgc ctc 49
Met Pro Ser Trp Ala Leu Phe Met Val Thr Ser Cys Leu
1 5 10

ctc ctg gcc cct caa aac ctg gcc caa gtc agc agc caa gat gtc tcc 97
Leu Leu Ala Pro Gln Asn Leu Ala Gln Val Ser Ser Gln Asp Val Ser
15 20 25

ttg ctg gca tca gac tca gag ccc ctg aag tgt ttc tcc cga aca ttt 145
Leu Leu Ala Ser Asp Ser Glu Pro Leu Lys Cys Phe Ser Arg Thr Phe
30 35. 40 45

40 / 74

gag gac ctc act tgc ttc tgg gat gag gaa gag gca gcg ccc agt ggg 193
Glu Asp Leu Thr Cys Phe Trp Asp Glu Glu Ala Ala Pro Ser Gly
50 55 60

aca tac cag ctg ctg tat gcc tac ccg cgg gag aag ccc cgt gct tgc 241
Thr Tyr Gln Leu Leu Tyr Ala Tyr Pro Arg Glu Lys Pro Arg Ala Cys
65 70 75

ccc ctg agt tcc cag agc atg ccc cac ttt gga acc cga tac gtg tgc 289
Pro Leu Ser Ser Gln Ser Met Pro His Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys
80 85 90

cag ttt cca gac cag gag gaa gtg cgt ctc ttc ttt ccg ctg cac ctc 337
Gln Phe Pro Asp Gln Glu Glu Val Arg Leu Phe Phe Pro Leu His Leu
95 100 105

tgg gtg aag aat gtg ttc cta aac cag act cgg act cag cga gtc ctc 385
Trp Val Lys Asn Val Phe Leu Asn Gln Thr Arg Thr Gln Arg Val Leu
110 115 120 125

ttt gtg gac agt gta ggc ctg ccg gct ccc ccc agt atc atc aag gcc 433
Phe Val Asp Ser Val Gly Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ile Ile Lys Ala
130 135 140

atg ggt ggg agc cag cca ggg gaa ctt cag atc agc tgg gag gag cca 481
Met Gly Gly Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gln Ile Ser Trp Glu Glu Pro

4 1 / 7 4

145 150 155

gct cca gaa atc agt gat ttc ctg agg tac gaa ctc cgc tat ggc ccc 529
Ala Pro Glu Ile Ser Asp Phe Leu Arg Tyr Glu Leu Arg Tyr Gly Pro

160 165 170

aga gat ccc aag aac tcc act ggt ccc acg gtc ata cag ctg att gcc 577
Arg Asp Pro Lys Asn Ser Thr Gly Pro Thr Val Ile Gln Leu Ile Ala
175 180 185

aca gaa acc tgc tgc cct gct ctg cag aga cct cac tca gcc tct gct 625
Thr Glu Thr Cys Cys Pro Ala Leu Gln Arg Pro His Ser Ala Ser Ala
190 195 200 205

ctg gac cag tct cca tgt gct cag ccc aca atg ccc tgg caa gat gga 673
Leu Asp Gln Ser Pro Cys Ala Gln Pro Thr Met Pro Trp Gln Asp Gly
210 215 220

cca aag cag acc tcc cca agt aga gaa gct tca gct ctg aca gca gag 721
Pro Lys Gln Thr Ser Pro Ser Arg Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ala Glu
225 230 235

ggt gga agc tgc ctc atc tca gga ctc cag cct ggc aac tcc tac tgg 769
Gly Gly Ser Cys Leu Ile Ser Gly Leu Gln Pro Gly Asn Ser Tyr Trp
240 245 250

4 2 / 7 4

ctg cag ctg tgc agc gaa cct gat ggg atc tcc ctc ggt ggc tcc tgg 817

Leu Gln Leu Cys Ser Glu Pro Asp Gly Ile Ser Leu Gly Gly Ser Trp

255

260

265

gga tcc tgg tcc ctc cct gtg act gtg gac ctg cct gga gat gca gtg 865

Gly Ser Trp Ser Leu Pro Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val

270

275

280

285

gca ctt gga ctg caa tgc ttt acc ttg gac ctg aag aat gtt acc tgt 913

Ala Leu Gly Leu Gln Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Asn Val Thr Cys

290

295

300

caa tgg cag caa cag gac cat gct agc tcc caa ggc ttc ttc tac cac 961

Gln Trp Gln Gln Gln Asp His Ala Ser Ser Gln Gly Phe Phe Tyr His

305

310

315

agc agg gca cgg tgc tgc ccc aga gac agg tac ccc atc tgg gag aac 1009

Ser Arg Ala Arg Cys Cys Pro Arg Asp Arg Tyr Pro Ile Trp Glu Asn

320

325

330

tgc gaa gag gaa gag aaa aca aat cca gga cta cag acc cca cag ttc 1057

Cys Glu Glu Glu Lys Thr Asn Pro Gly Leu Gln Thr Pro Gln Phe

335

340

345

tct cgc tgc cac ttc aag tca cga aat gac agc att att cac atc ctt 1105

Ser Arg Cys His Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Ile Ile His Ile Leu

4 3 / 7 4

350 355 360 365
gtg gag gtg acc aca gcc ccg ggt act gtt cac agc tac ctg ggc tcc 1153
Val Glu Val Thr Thr Ala Pro Gly Thr Val His Ser Tyr Leu Gly Ser

370 375 380
cct ttc tgg atc cac cag gct gtg cgc ctc ccc acc cca aac ttg cac 1201
Pro Phe Trp Ile His Gln Ala Val Arg Leu Pro Thr Pro Asn Leu His

385 390 395
tgg agg gag atc tcc agt ggg cat ctg gaa ttg gag tgg cag cac cca 1249
Trp Arg Glu Ile Ser Ser Gly His Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Pro

400 405 410
tcg tcc tgg gca gcc caa gag acc tgt tat caa ctc cga tac aca gga 1297
Ser Ser Trp Ala Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly

415 420 425
gaa ggc cat cag gac tgg aag gtg ctg gag ccg cct ctc ggg gcc cga 1345
Glu Gly His Gln Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Pro Leu Gly Ala Arg

430 435 440 445
gga ggg acc ctg gag ctg cgc ccg cga tct cgc tac cgt tta cag ctg 1393
Gly Gly Thr Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu

450 455 460

44 / 74

cgc gcc agg ctc aac ggc ccc acc tac caa ggt ccc tgg agc tcg tgg 1441
Arg Ala Arg Leu Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp
465 470 475

tcg gac cca act agg gtg gag acc gcc acc gag acc gcc tgg atc tcc 1489
Ser Asp Pro Thr Arg Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp Ile Ser
480 485 490

ttg gtg acc gct ctg cat cta gtg ctg ggc ctc agc gcc gtc ctg ggc 1537
Leu Val Thr Ala Leu His Leu Val Leu Gly Leu Ser Ala Val Leu Gly
495 500 505

ctg ctg ctg ctg agg tgg cag ttt cct gca cac tac agg aga ctg agg 1585
Leu Leu Leu Leu Arg Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg
510 515 520 525

cat gcc ctg tgg ccc tca ctt cca gac ctg cac cgg gtc cta ggc cag 1633
His Ala Leu Trp Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln
530 535 540

tac ctt agg gac act gca gcc ctg agc ccg ccc aag gcc aca gtc tca 1681
Tyr Leu Arg Asp Thr Ala Ala Leu Ser Pro Pro Lys Ala Thr Val Ser
545 550 555

gat acc tgt gaa gaa gtg gaa ccc agc ctc ctt gaa atc ctc ccc aag 1729
Asp Thr Cys Glu Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys

45 / 74

560 565 570

tcc tca gag agg act cct ttg ccc ctg tgt tcc tcc cag gcc cag atg 1777
Ser Ser Glu Arg Thr Pro Leu Pro Leu Cys Ser Ser Gln Ala Gln Met

575 580 585

gac tac cga aga ttg cag cct tct tgc ctg ggg acc atg ccc ctg tct 1825
Asp Tyr Arg Arg Leu Gln Pro Ser Cys Leu Gly Thr Met Pro Leu Ser
590 595 600 605

gtg tgc cca ccc atg gct gag tca ggg tcc tgc tgt acc acc cac att 1873
Val Cys Pro Pro Met Ala Glu Ser Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile

610 615 620

gcc aac cat tcc tac cta cca cta agc tat tgg cag cag cct tga 1918
Ala Asn His Ser Tyr Leu Pro Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro

625 630 635

gtcgac 1924

<210> 10

<211> 635

<212> PRT

<213> Homo sapiens

4 6 / 7 4

<400> 10

Met Pro Ser Trp Ala Leu Phe Met Val Thr Ser Cys Leu Leu Ala

1 5 10 15

Pro Gln Asn Leu Ala Gln Val Ser Ser Gln Asp Val Ser Leu Leu Ala

20 25 30

Ser Asp Ser Glu Pro Leu Lys Cys Phe Ser Arg Thr Phe Glu Asp Leu

35 40 45

Thr Cys Phe Trp Asp Glu Glu Glu Ala Ala Pro Ser Gly Thr Tyr Gln

50 55 60

Leu Leu Tyr Ala Tyr Pro Arg Glu Lys Pro Arg Ala Cys Pro Leu Ser

65 70 75 80

Ser Gln Ser Met Pro His Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys Gln Phe Pro

85 90 95

Asp Gln Glu Glu Val Arg Leu Phe Phe Pro Leu His Leu Trp Val Lys

100 105 110

Asn Val Phe Leu Asn Gln Thr Arg Thr Gln Arg Val Leu Phe Val Asp

115 120 125

Ser Val Gly Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ile Ile Lys Ala Met Gly Gly

47 / 74

130 135 140

Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gln Ile Ser Trp Glu Glu Pro Ala Pro Glu

145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Leu Arg Tyr Glu Leu Arg Tyr Gly Pro Arg Asp Pro

165 170 175

Lys Asn Ser Thr Gly Pro Thr Val Ile Gln Leu Ile Ala Thr Glu Thr

180 185 190

Cys Cys Pro Ala Leu Gln Arg Pro His Ser Ala Ser Ala Leu Asp Gln

195 200 205

Ser Pro Cys Ala Gln Pro Thr Met Pro Trp Gln Asp Gly Pro Lys Gln

210 215 220

Thr Ser Pro Ser Arg Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ala Glu Gly Gly Ser

225 230 235 240

Cys Leu Ile Ser Gly Leu Gln Pro Gly Asn Ser Tyr Trp Leu Gln Leu

245 250 255

Cys Ser Glu Pro Asp Gly Ile Ser Leu Gly Gly Ser Trp Gly Ser Trp

260 265 270

4 8 / 7 4

Ser Leu Pro Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val Ala Leu Gly

275

280

285

Leu Gln Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Asn Val Thr Cys Gln Trp Gln

290

295

300

Gln Gln Asp His Ala Ser Ser Gln Gly Phe Phe Tyr His Ser Arg Ala

305

310

315

320

Arg Cys Cys Pro Arg Asp Arg Tyr Pro Ile Trp Glu Asn Cys Glu Glu

325

330

335

Glu Glu Lys Thr Asn Pro Gly Leu Gln Thr Pro Gln Phe Ser Arg Cys

340

345

350

His Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Ile Ile His Ile Leu Val Glu Val

355

360

365

Thr Thr Ala Pro Gly Thr Val His Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Phe Trp

370

375

380

Ile His Gln Ala Val Arg Leu Pro Thr Pro Asn Leu His Trp Arg Glu

385

390

395

400

Ile Ser Ser Gly His Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Pro Ser Ser Trp

405

410

415

4 9 / 7 4

Ala Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly Glu Gly His

420 425 430

Gln Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Pro Leu Gly Ala Arg Gly Gly Thr

435 440 445

Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu Arg Ala Arg

450 455 460

Leu Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp Ser Asp Pro

465 470 475 480

Thr Arg Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp Ile Ser Leu Val Thr

485 490 495

Ala Leu His Leu Val Leu Gly Leu Ser Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu

500 505 510

Leu Arg Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg His Ala Leu

515 520 525

Trp Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln Tyr Leu Arg

530 535 540

Asp Thr Ala Ala Leu Ser Pro Pro Lys Ala Thr Val Ser Asp Thr Cys

50 / 74

545 550 555 560

Glu Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys Ser Ser Glu

565 570 575

Arg Thr Pro Leu Pro Leu Cys Ser Ser Gln Ala Gln Met Asp Tyr Arg

580 585 590

Arg Leu Gln Pro Ser Cys Leu Gly Thr Met Pro Leu Ser Val Cys Pro

595 600 605

Pro Met Ala Glu Ser Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile Ala Asn His

610 615 620

Ser Tyr Leu Pro Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro

625 630 635

<210> 11

<211> 1924

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (11)..(1918)

51 / 74

<223>

<400> 11

gaattccacc atg ccc tcc tgg gcc ctc ttc atg gtc acc tcc tgc ctc 49
Met Pro Ser Trp Ala Leu Phe Met Val Thr Ser Cys Leu
1 5 10

ctc ctg gcc cct caa aac ctg gcc caa gtc agc agc caa gat gtc tcc 97
Leu Leu Ala Pro Gln Asn Leu Ala Gln Val Ser Ser Gln Asp Val Ser
15 20 25

ttg ctg gca tca gac tca gag ccc ctg aag tgt ttc tcc cga aca ttt 145
Leu Leu Ala Ser Asp Ser Glu Pro Leu Lys Cys Phe Ser Arg Thr Phe
30 35 40 45

gag gac ctc act tgc ttc tgg gat gag gaa gag gca gcg ccc agt ggg 193
Glu Asp Leu Thr Cys Phe Trp Asp Glu Glu Ala Ala Pro Ser Gly
50 55 60

aca tac cag ctg ctg tat gcc tac ccg cgg gag aag ccc cgt gct tgc 241
Thr Tyr Gln Leu Leu Tyr Ala Tyr Pro Arg Glu Lys Pro Arg Ala Cys
65 70 75

ccc ctg agt tcc cag agc atg ccc cac ttt gga acc cga tac gtg tgc 289
Pro Leu Ser Ser Gln Ser Met Pro His Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys
80 85 90

52 / 74

cag ttt cca gac cag gag gaa gtg cgt ctc ttc ttt ccg ctg cac ctc 337

Gln Phe Pro Asp Gln Glu Glu Val Arg Leu Phe Phe Pro Leu His Leu

95

100

105

tgg gtg aag aat gtg ttc cta aac cag act cgg act cag cga gtc ctc 385

Trp Val Lys Asn Val Phe Leu Asn Gln Thr Arg Thr Gln Arg Val Leu

110

115

120

125

ttt gtg gac agt gta ggc ctg ccg gct ccc ccc agt atc atc aag gcc 433

Phe Val Asp Ser Val Gly Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ile Ile Lys Ala

130

135

140

atg ggt ggg agc cag cca ggg gaa ctt cag atc agc tgg gag gag cca 481

Met Gly Gly Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gln Ile Ser Trp Glu Glu Pro

145

150

155

gct cca gaa atc agt gat ttc ctg agg tac gaa ctc cgc tat ggc ccc 529

Ala Pro Glu Ile Ser Asp Phe Leu Arg Tyr Glu Leu Arg Tyr Gly Pro

160

165

170

aga gat ccc aag aac tcc act ggt ccc acg gtc ata cag ctg att gcc 577

Arg Asp Pro Lys Asn Ser Thr Gly Pro Thr Val Ile Gln Leu Ile Ala

175

180

185

aca gaa acc tgc tgc cct gct ctg cag aga cct cac tca gcc tct gct 625

53 / 74

Thr Glu Thr Cys Cys Pro Ala Leu Gln Arg Pro His Ser Ala Ser Ala

190

195

200

205

ctg gac cag tct cca tgt gct cag ccc aca atg ccc tgg caa gat gga . 673

Leu Asp Gln Ser Pro Cys Ala Gln Pro Thr Met Pro Trp Gln Asp Gly

210

215

220

cca aag cag acc tcc cca agt aga gaa gct tca gct ctg aca gca gag 721

Pro Lys Gln Thr Ser Pro Ser Arg Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ala Glu

225

230

235

ggt gga agc tgc ctc atc tca gga ctc cag cct ggc aac tcc tac tgg 769

Gly Gly Ser Cys Leu Ile Ser Gly Leu Gln Pro Gly Asn Ser Tyr Trp

240

245

250

ctg cag ctg cgc agc gaa cct gat ggg atc tcc ctc ggt ggc tcc tgg 817

Leu Gln Leu Arg Ser Glu Pro Asp Gly Ile Ser Leu Gly Gly Ser Trp

255

260

265

gga tcc tgg tcc ctc act gtg act gtg gac ctg cct gga gat gca gtg 865

Gly Ser Trp Ser Leu Thr Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val

270

275

280

285

gca ctt gga ctg caa tgc ttt acc ttg gac ctg aag aat gtt acc tgt 913

Ala Leu Gly Leu Gln Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Asn Val Thr Cys

290

295

300

5 4 / 7 4

caa tgg cag caa cag gac cat gct agc tcc caa ggc ttc ttc tac cac 961

Gln Trp Gln Gln Asp His Ala Ser Ser Gln Gly Phe Phe Tyr His

305

310

315

agc agg gca cgg tgc tgc ccc aga gac agg tac ccc atc tgg gag aac 1009

Ser Arg Ala Arg Cys Cys Pro Arg Asp Arg Tyr Pro Ile Trp Glu Asn

320

325

330

tgc gaa gag gaa gag aaa aca aat cca gga cta cag acc cca cag ttc 1057

Cys Glu Glu Glu Glu Lys Thr Asn Pro Gly Leu Gln Thr Pro Gln Phe

335

340

345

tct cgc tgc cac ttc aag tca cga aat gac agc att att cac atc ctt 1105

Ser Arg Cys His Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Ile Ile His Ile Leu

350

355

360

365

gtg gag gtg acc aca gcc ccg ggt act gtt cac agc tac ctg ggc tcc 1153

Val Glu Val Thr Thr Ala Pro Gly Thr Val His Ser Tyr Leu Gly Ser

370

375

380

cct ttc tgg atc cac cag gct gtg cgc ctc ccc acc cca aac ttg cac 1201

Pro Phe Trp Ile His Gln Ala Val Arg Leu Pro Thr Pro Asn Leu His

385

390

395

tgg agg gag atc tcc agt ggg cat ctg gaa ttg gag tgg cag cac cca 1249

55 / 74

Trp Arg Glu Ile Ser Ser Gly His Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Pro

400 405 410

tcg tcc tgg gca gcc caa gag acc tgt tat caa ctc cga tac aca gga 1297

Ser Ser Trp Ala Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly

415 420 425

gaa ggc cat cag gac tgg aag gtg ctg gag ccg cct ctc ggg gcc cga 1345

Glu Gly His Gln Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Pro Leu Gly Ala Arg

430 435 440 445

gga ggg acc ctg gag ctg cgc ccg cga tct cgc tac cgt tta cag ctg 1393

Gly Gly Thr Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu

450 455 460

cgc gcc agg ctc aac ggc ccc acc tac caa ggt ccc tgg agc tcg tgg 1441

Arg Ala Arg Leu Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp

465 470 475

tcg gac cca act agg gtg gag acc gcc acc gag acc gcc tgg atc tcc 1489

Ser Asp Pro Thr Arg Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp Ile Ser

480 485 490

ttg gtg acc gct ctg cat cta gtg ctg ggc ctc agc gcc gtc ctg ggc 1537

Leu Val Thr Ala Leu His Leu Val Leu Gly Leu Ser Ala Val Leu Gly

495 500 505

5 6 / 7 4

ctg ctg ctg ctg agg tgg cag ttt cct gca cac tac agg aga ctg agg 1585
Leu Leu Leu Leu Arg Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg
510 515 520 525

cat gcc ctg tgg ccc tca ctt cca gac ctg cac cgg gtc cta ggc cag 1633
His Ala Leu Trp Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln
530 535 540

tac ctt agg gac act gca gcc ctg agc ccg ccc aag gcc aca gtc tca 1681
Tyr Leu Arg Asp Thr Ala Ala Leu Ser Pro Pro Lys Ala Thr Val Ser
545 550 555

gat acc tgt gaa gaa gtg gaa ccc agc ctc ctt gaa atc ctc ccc aag 1729
Asp Thr Cys Glu Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys
560 565 570

tcc tca gag agg act cct ttg ccc ctg tgt tcc tcc cag gcc cag atg 1777
Ser Ser Glu Arg Thr Pro Leu Pro Leu Cys Ser Ser Gln Ala Gln Met
575 580 585

gac tac cga aga ttg cag cct tct tgc ctg ggg acc atg ccc ctg tct 1825
Asp Tyr Arg Arg Leu Gln Pro Ser Cys Leu Gly Thr Met Pro Leu Ser
590 595 600 605

gtg tgc cca ccc atg gct gag tca ggg tcc tgc tgt acc acc cac att 1873

5 7 / 7 4

Val Cys Pro Pro Met Ala Glu Ser Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile

610

615

620

gcc aac cat tcc tac cta cca cta agc tat tgg cag cag cct tga .1918

Ala Asn His Ser Tyr Leu Pro Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro

625

630

635

gtcgac 1924

<210> 12

<211> 635

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Pro Ser Trp Ala Leu Phe Met Val Thr Ser Cys Leu Leu Ala

1

5

10

15

Pro Gln Asn Leu Ala Gln Val Ser Ser Gln Asp Val Ser Leu Leu Ala

20

25

30

Ser Asp Ser Glu Pro Leu Lys Cys Phe Ser Arg Thr Phe Glu Asp Leu

35

40

45

Thr Cys Phe Trp Asp Glu Glu Glu Ala Ala Pro Ser Gly Thr Tyr Gln

58 / 74

50 55 60

Leu Leu Tyr Ala Tyr Pro Arg Glu Lys Pro Arg Ala Cys Pro Leu Ser
65 70 75 80

Ser Gln Ser Met Pro His Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys Gln Phe Pro
85 90 95

Asp Gln Glu Glu Val Arg Leu Phe Phe Pro Leu His Leu Trp Val Lys
100 105 110

Asn Val Phe Leu Asn Gln Thr Arg Thr Gln Arg Val Leu Phe Val Asp
115 120 125

Ser Val Gly Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ile Ile Lys Ala Met Gly Gly
130 135 140

Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gln Ile Ser Trp Glu Glu Pro Ala Pro Glu
145 150 155 160

Ile Ser Asp Phe Leu Arg Tyr Glu Leu Arg Tyr Gly Pro Arg Asp Pro
165 170 175

Lys Asn Ser Thr Gly Pro Thr Val Ile Gln Leu Ile Ala Thr Glu Thr
180 185 190

5 9 / 7 4

Cys Cys Pro Ala Leu Gln Arg Pro His Ser Ala Ser Ala Leu Asp Gln

195 200 205

Ser Pro Cys Ala Gln Pro Thr Met Pro Trp Gln Asp Gly Pro Lys Gln

210 215 220

Thr Ser Pro Ser Arg Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ala Glu Gly Gly Ser

225 230 235 240

Cys Leu Ile Ser Gly Leu Gln Pro Gly Asn Ser Tyr Trp Leu Gln Leu

245 250 255

Arg Ser Glu Pro Asp Gly Ile Ser Leu Gly Gly Ser Trp Gly Ser Trp

260 265 270

Ser Leu Thr Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val Ala Leu Gly

275 280 285

Leu Gln Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Asn Val Thr Cys Gln Trp Gln

290 295 300

Gln Gln Asp His Ala Ser Ser Gln Gly Phe Phe Tyr His Ser Arg Ala

305 310 315 320

Arg Cys Cys Pro Arg Asp Arg Tyr Pro Ile Trp Glu Asn Cys Glu Glu

325 330 335

60 / 74

Glu Glu Lys Thr Asn Pro Gly Leu Gln Thr Pro Gln Phe Ser Arg Cys

340 345 350

His Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Ile Ile His Ile Leu Val Glu Val

355 360 365

Thr Thr Ala Pro Gly Thr Val His Ser Tyr Leu Gly Ser Pro Phe Trp

370 375 380

Ile His Gln Ala Val Arg Leu Pro Thr Pro Asn Leu His Trp Arg Glu

385 390 395 400

Ile Ser Ser Gly His Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Pro Ser Ser Trp

405 410 415

Ala Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly Glu Gly His

420 425 430

Gln Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Pro Leu Gly Ala Arg Gly Thr

435 440 445

Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu Arg Ala Arg

450 455 460

Leu Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp Ser Asp Pro

6 1 / 7 4

465 470 475 480

Thr Arg Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp Ile Ser Leu Val Thr

485 490 495

Ala Leu His Leu Val Leu Gly Leu Ser Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu

500 505 510

Leu Arg Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg His Ala Leu

515 520 525

Trp Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln Tyr Leu Arg

530 535 540

Asp Thr Ala Ala Leu Ser Pro Pro Lys Ala Thr Val Ser Asp Thr Cys

545 550 555 560

Glu Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys Ser Ser Glu

565 570 575

Arg Thr Pro Leu Pro Leu Cys Ser Ser Gln Ala Gln Met Asp Tyr Arg

580 585 590

Arg Leu Gln Pro Ser Cys Leu Gly Thr Met Pro Leu Ser Val Cys Pro

595 600 605

6 2 / 7 4

Pro Met Ala Glu Ser Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile Ala Asn His

610

615

620

Ser Tyr Leu Pro Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro

625

630

635

<210> 13

<211> 1560

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1560)

<223>

<400> 13

atg aga gtg ctg att cct ttg tgg ctg ttc aca gcc ttt cct ggt acc 48

Met Arg Val Leu Ile Pro Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Thr

1

5

10

15

ctg tct gat gtg cag ctg cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct 96

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro

20

25

30

6 3 / 7 4

tct cag tct ctg tcc ctc acc tgc act gtc act ggc tac tca atc acc 144

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr

35

40

45

agt gat tat gcc tgg agc tgg atc cga cag tta cca gga aac aaa ctg 192

Ser Asp Tyr Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Asn Lys Leu

50

55

60

gag tgg atg ggc tac ata acg tac agt ggt tac tct atc tac aat cca 240

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Tyr Ser Ile Tyr Asn Pro

65

70

75

80

tct ctc aaa agt cga atc tct atc agt cga gac aca tcc aag aac cag 288

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln

85

90

95

ttg ttc ctg cag tta aat tct gtg acc act gag gac aca gcc aca tat 336

Leu Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr

100

105

110

tac tgt gtg ggc ggg tat gac aat atg gac tat tgg ggt caa gga acc 384

Tyr Cys Val Gly Gly Tyr Asp Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115

120

125

tca gtc acc gtc tcc tca ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt tcg 432

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

6 4 / 7 4

130 135 140

ggt ggt ggc gga tcg caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg 480
Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met

145 150 155 160

tct gca tct cct ggg gag aag gtc acc ttg acc tgc agt gcc agc tca 528
Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser
165 170 175

agt gta agt tcc agc cac tta tac tgg tat cag cag aag cca ggg tcc 576
Ser Val Ser Ser Ser His Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser
180 185 190

tcc ccc aaa ctc tgg att tat agc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc 624
Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
195 200 205

cct gct cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc tcc tat tct ctc aca 672
Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
210 215 220

atc agc aac atg gag act gaa gat gct gcc tct tat ttc tgc cat cag 720
Ile Ser Asn Met Glu Thr Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln
225 230 235 240

6 5 / 7 4

tgg agt agt tac cca tgg acg ttc ggt ggg ggc acc aag ctg gaa atc 768

Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

245

250

255

aaa gga ggt ggt gga tcg ggt ggt ggt tcg gga ggc ggt gga tcg 816

Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

260

265

270

gat gtg cag ctg cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct tct cag 864

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

275

280

285

tct ctg tcc ctc acc tgc act gtc act ggc tac tca atc acc agt gat 912

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

290

295

300

tat gcc tgg agc tgg atc cga cag tta cca gga aac aaa ctg gag tgg 960

Tyr Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

305

310

315

320

atg ggc tac ata acg tac agt ggt tac tct atc tac aat cca tct ctc 1008

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Tyr Ser Ile Tyr Asn Pro Ser Leu

325

330

335

aaa agt cga atc tct atc agt cga gac aca tcc aag aac cag ttg ttc 1056

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Phe

6 6 / 7 4

340 345 350

ctg cag tta aat tct gtg acc act gag gac aca gcc aca tat tac tgt 1104
Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

355 360 365

gtg ggc ggg tat gac aat atg gac tat tgg ggt caa gga acc tca gtc 1152
Val Gly Gly Tyr Asp Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

370 375 380

acc gtc tcc tca ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt tcg ggt ggt 1200
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

385 390 395 400

ggc gga tcg caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca 1248
Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala

405 410 415

tct cct ggg gag aag gtc acc ttg acc tgc agt gcc agc tca agt gta 1296
Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Val

420 425 430

agt tcc agc cac tta tac tgg tat cag cag aag cca ggg tcc tcc ccc 1344
Ser Ser Ser His Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro

435 440 445

67 / 74

aaa ctc tgg att tat agc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct gct 1392

Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala

450

455

460

cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc tcc tat tct ctc aca atc agc 1440

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

465

470

475

480

aac atg gag act gaa gat gct gcc tct tat ttc tgc cat cag tgg agt 1488

Asn Met Glu Thr Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser

485

490

495

agt tac cca tgg acg ttc ggt ggg ggc acc aag ctg gaa atc aaa gac 1536

Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp

500

505

510

tac aag gat gac gac gat aag tga 1560

Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

515

<210> 14

<211> 519

<212> PRT

<213> Mus musculus

6 8 / 7 4

<400> 14

Met Arg Val Leu Ile Pro Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Thr

1 5 10 15

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro

20 25 30

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr

35 40 45

Ser Asp Tyr Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Asn Lys Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Tyr Ser Ile Tyr Asn Pro

65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln

85 90 95

Leu Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr

100 105 110

Tyr Cys Val Gly Gly Tyr Asp Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

6 9 / 7 4

130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met

145 150 155 160

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Val Ser Ser Ser His Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser

180 185 190

Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val

195 200 205

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr

210 215 220

Ile Ser Asn Met Glu Thr Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln

225 230 235 240

Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

245 250 255

Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

260 265 270

70 / 74

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

275 280 285

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

290 295 300

Tyr Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

305 310 315 320

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Tyr Ser Ile Tyr Asn Pro Ser Leu

325 330 335

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Phe

340 345 350

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

355 360 365

Val Gly Gly Tyr Asp Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

370 375 380

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly

385 390 395 400

Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala

405 410 415

71 / 74

Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val

420 425 430

Ser Ser Ser His Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro

435 440 445

Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala

450 455 460

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

465 470 475 480

Asn Met Glu Thr Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser

485 490 495

Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp

500 505 510

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

515

<210> 15

<211> 82

<212> DNA

7 2 / 7 4

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

tagaattcca ccatgagagt gctgattcct ttgtggctgt tcacagcctt tcctggtacc 60

ctgtctgatg tgcagctgca gg 82

<210> 16

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

tgggtgagaa caatttgcga tccgccacca cccgaaccac caccacccga accaccacca 60

cctgaggaga cggtgactga gg 82

<210> 17

7 3 / 7 4

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 17

cagtcaccgt ctcctcaggt ggtggtggtt cgggtggtgg tggttcgggt ggtggcggat 60

cgcaaattgt ttcacccag tc 82

<210> 18

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 18

attgcggccg citatcaatt atcgtcgta tccttgtagt ctttgatttc cagcttggtg 60

<210> 19

7 4 / 7 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 19

gatgtgcagc tgcaggagtc gggac

25

<210> 20

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 20

cctgcagctg cacatccgat ccaccgcctc ccgaaccacc accacccgat ccaccacctc 60

cttgcattc cagcttggtc c

81

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003334

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K16/28, A61K39/395, A61P7/00, A61P7/04, G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K16/28, A61K39/395, A61P7/00, A61P7/04, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-506135 A (Abbott Laboratories), 15 May, 2001 (15.05.01), & WO 98/28331 A2 & EP 946726 A2 & MX 9905856 A1 & US 2001/0006796 A1 & US 6323000 B2 & US 2003/0073161 A1 & US 6683157 B2	1-15,18-29
Y	Ballmaier M. c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia., Blood, 2001, Vol.97, No.1, pages 139-46	1-15,18-29
Y	JP 2001-513999 A (Genentech, Inc.), 11 September, 2001 (11.09.01), & WO 99/10494 A2 & AU 9888312 A & EP 1009831 A2 & US 6342220 B1 & AU 755822 B	1-15,18-29

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 May, 2004 (27.05.04)Date of mailing of the international search report
15 June, 2004 (15.06.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/003334

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 2002/0193571 A1 (CARTER P.J. et al.), 19 December, 2002 (19.12.02), (Family: none)	1-4, 10-12 5-9, 13-15, 18-29
A	WO 01/64713 A2 (GASCHE C.), 07 September, 2001 (07.09.01), & AU 200156174 A	1-15, 18-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003334

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - in written format
 - in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in computer readable form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2004/003334**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 16, 17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 16 and 17 pertain to methods for treatment of a disease and thus relate to methods of treating the human or animal body by therapy. Therefore, these claims relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2004/003334
--

Concerning the "agonist" as set forth in claim 1, only antibodies, namely a part of the claimed agonists, are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

The same applies to "a substance obtained by a screening method" as set forth in claims 3 to 7, 10, 12 to 15, 23, 24, 26 to 29 and 22.

Such being the case, the search was made exclusively on the part supported by the description and disclosed therein, i.e., the antibodies. Claims 2, 8, 9, 11, 18 to 21 and 25 were completely searched.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int Cl' C07K16/28, A61K39/395, A61P7/00, A61P7/04, G01N33/15, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int Cl' C07K16/28, A61K39/395, A61P7/00, A61P7/04, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JST Plus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2001-506135 A (アボット・ラボラトリーズ) 2001.05.15 &WO 98/28331 A2 &EP 946726 A2 &MX 9905856 A1 &US 2001/0006796 A1 &US 6323000 B2 &US 2003/0073161 A1 &US 6683157 B2	1-15, 18-29
Y	Ballmaier M, c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia., Blood, 2001, Vol. 97, No. 1, p. 139-46.	1-15, 18-29

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 27.05.2004	国際調査報告の発送日 15.6.2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 六笠 紀子 4B 9735 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2001-513999 A(ジェネンテク・インコーポレイテッド) 2001.09.11 & WO 99/10494 A2 & AU 9888312 A & EP 1009831 A2 & US 6342220 B1 & AU 755822 B	1-15, 18-29
X A	US 2002/0193571 A1 (CARTER P J et al) 2002.12.19 (ファミリー無し)	<u>1-4, 10-12</u> 5-9, 13-15, 18-29
A	WO 01/64713 A2 (GASCHE C) 2001.09.07 & AU 200156174 A	1-15, 18-29

請求の範囲1の「アゴニスト」について、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているアゴニストは、抗体のみでありクレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎない。

請求の範囲3乃至7、10、12乃至15、23、24、26乃至29、及び請求の範囲22の「スクリーニング方法により得られた物質」についても同様である。

よって、調査は明細書に裏付けられ、開示されている部分、すなわち抗体についてのみ行った。また、請求の範囲2、8、9、11、18乃至21、25については完全な調査を行った。

第Ⅰ欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ 配列表
 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット 書面
 コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる
 この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された
 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 16, 17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲16及び17は、疾患を治療する方法であるから、人体または動物を治療する方法に該当するので、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。